Aus dem Institut für Physiologische Chemie II

der Universität Düsseldorf

Direktor : Professor Dr . W . Staib

Glucoseutilisation und Aminosäurefreisetzung der Skelettmuskulatur nach längerfristiger Applikation von Glucocorticoiden und Insulin

Untersuchungen am isoliert perfundierten Hinterkörper adrenalektomiert-diabetischer Ratten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin .
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christoph Cassier

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536502_0053

Aus dem Institut für Physiologische Chemie II

der Universität Düsseldorf

Direktor : Professor Dr . W . Staib

Glucoseutilisation und Aminosäurefreisetzung der Skelettmuskulatur nach längerfristiger Applikation von Glucocorticoiden und Insulin

Untersuchungen am isoliert perfundierten Hinterkörper adrenalektomiert-diabetischer Ratten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christoph Cassier

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. H.T. Brüster

Referent
gez.: Prof. Dr. W. Staib

Korreferent
gez.: Prof. Dr. M. Berger

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	VERSUCHSPLANUNG	4
III.	MATERIAL UND METHODIK	
	A) Vorbehandlung der Tiere	6
	B) Hinterkörperpräparation	7
	C) Perfusionsmedium	9
	D) Perfusionssystem	10
	E) Perfusionsablauf	11
	F) Reagentien	12
	G) Analysenmethodik	13
	H) Auswertung	15
IV.	ERGEBNISSE	
	in vivo-Untersuchungen	
	A) Gewichtsverhalten	17
	B) Blutglucosekonzentration	19
	C) Ketonkörper im Urin	22
	D) Muskelglykogen (M.gastrocnemius)	23
	in vitro-Untersuchungen	
	A) Angaben zum Hinterkörperpräparat	24
	B) Kontrollparameter der Perfusion	25
	C) Glucose	
	1. Aufnahmerate während der Perfusion	26
	2. Konzentration freier Glucose im M.gastrocnemius	28
	D) Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat im M.gastrocnemius	29
	E) Glykogen im M.gastrocnemius	31
	F) Pyruvat	
	1. Utilisationsrate während der Perfusion	32
	2. Konzentration im M.gastrocnemius	33
	G) Lactat	
	1. Freisetzungsrate während der Perfusion	34
	2. Konzentration im M.gastrocnemius	35

Seite

H) Lactat/Pyruvat-Quotient im Muskel 36
I) Alanin
1. Freisetzungsrate während der Perfusion 37
2. Konzentration im M.gastrocnemius 38
K) Glutaminfreisetzung während der Perfusion 40
L) Glutamatfreisetzung während der Perfusion 41
M) Citratkonzentration im M.gastrocnemius 42
N) Sauerstoffverbrauch während der Perfusion 43
Zusammenfassung der Ergebnisse 44
Tabellenanhang 46

V. DISKUSSION
A) Glucose 50
B) Glykogen 58
C) Pyruvat 59
D) Lactat 61
E) Alanin 63
F) Glutamin 69

VI. ZUSAMMENFASSUNG 71

VII. DANKSAGUNG 73

VIII. LITERATURVERZEICHNIS 74

LEBENSLAUF 88

I. EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit werden Glucocorticoidwirkungen auf den Muskelstoffwechsel und der Einfluß dieser Hormone auf typische Insulineffekte dargestellt. Das Hauptinteresse gilt dabei der Glucoseutilisation und Aminosäurefreisetzung durch die Muskulatur.

Als Versuchsmodell diente der isoliert perfundierte Rattenhinterkörper, der überwiegend aus quergestreifter Skelettmuskulatur besteht und als physiologisch relevantes Modell des Muskelstoffwechsels in vivo angesehen werden kann (78).

Vorangegangene Experimente unseres Institutes mit diesem Muskelpräparat (16, 46, 83, 87, 89) dienten der Abklärung kurzfristiger Glucocorticoideffekte auf die Muskulatur nach einmaliger Gabe des synthetischen Hormons Betamethason. Als wichtiger Befund dieser Untersuchungen ist die Hemmung der muskulären Glucoseutilisation durch Glucocorticoide zu nennen, die unter Verwendung anderer Muskelpräparate nie eindeutig nachzuweisen war (12, 31, 76). Inwieweit dieser Effekt nach längerfristiger Behandlung mit Glucocorticoiden zu bestätigen ist oder eine Akzentuierung erfährt, ist eine der Fragestellungen dieser Untersuchung. Darüber hinaus soll der Frage nachgegangen werden, welche Sequenz der Glucoseutilisation (Membrantransport, intracellulärer Glucoseabbau) für die Hemmung der Glucoseaufnahme verantwortlich ist.

Als Versuchstiere wurden adrenalektomiert-diabetische Tiere gewählt, um Glucocorticoidwirkung und Insulinwirkung besser voneinander abgrenzen zu können. Da die mehrtägige Applikation von Glucocorticoiden zu einer Erhöhung der Insulin-Plasmaspiegel führt (51, 88, 91), ist bei Verwendung von lediglich adrenalektomierten Tieren eine Modifikation der Glucocorticoidwirkungen durch sekundäre Insulineffekte zu erwarten.

Neben dem Studium der isolierten Hormoneffekte auf die Muskulatur bietet das gewählte Tiermodell die Möglichkeit, bei bihormonaler Substitutionsbehandlung die Interaktion von

Glucocorticoiden und Insulin im Sinne eines Antagonismus, Synergismus oder der einseitigen Dominanz eines Hormons auf die verschiedenen Stoffwechselabschnitte zu erkennen. Im Mittelpunkt des Interesses steht dabei ein möglicher Antagonismus von Glucocorticoiden und Insulin hinsichtlich der Glucoseaufnahme der Muskulatur. Ausgangspunkt für derartige Überlegungen sind Berichte aus dem Bereich der Humanmedizin, nach denen es bei längerer Behandlung mit Steroiden (68), ebenso wie beim CUSHING-Syndrom (99), zu einer Verschlechterung der Glucosetoleranz kommt; dabei sind häufig sogar erhöhte Insulinkonzentrationen im Blut zu beobachten. Diese Befunde werden im Sinne einer glucocorticoidbedingten „Insulinresistenz" der Glucoseaufnahme peripherer Gewebe gedeutet, ohne daß bisher klare experimentelle Befunde zu diesem Problem vorliegen.

Bezüglich der Glucoseaufnahme durch die Muskulatur, die einen wesentlichen Anteil am Stoffwechsel der peripheren Gewebe hat, zeigte sich in den vorangegangenen Kurzzeit-Experimenten (16) vielmehr eine eindeutige Dominanz der Insulinwirkung gegenüber der Glucocorticoidwirkung. Es wird daher abzuklären sein, ob nach längerfristiger Glucocorticoidbehandlung, die der oben angegebenen Situation mehr entspricht, eine Verminderung der Insulinwirkung auf die Glucoseutilisation der isolierten Skelettmuskulatur nachweisbar ist.

Einen zweiten Schwerpunkt früherer Untersuchungen bildete der Aminosäurestoffwechsel des Muskels. Hierbei nehmen die beiden Aminosäuren Alanin und Glutamin eine zentrale Stellung ein. Sie machen zusammen etwa die Hälfte der vom Muskel freigesetzten Aminosäuren aus (25, 79). Da die hohen Freisetzungsraten nicht durch eine selektive Proteolyse zu erklären sind, muß ein überwiegender Teil dieser Aminosäuren durch Neusynthese im Muskel synthetisiert werden (10, 11, 25, 28).

Die Aminosäure Alanin stellt ein bevorzugtes Substrat für die Lebergluconeogenese dar. Erhöhung der peripheren Alaninfreisetzung, verbunden mit vermehrter hepatischer Extraktion, leistet einen wesentlichen Beitrag zur Glucoseneubildung und

damit zur Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase während der ersten Tage eines Fastenzustandes (24).

Im Vordergrund der vorliegenden Arbeit steht dabei die Frage, in welcher Weise die Freisetzung der beiden Aminosäuren durch längerfristige Applikation von Glucocorticoiden und Insulin als möglichen physiologischen Regulatoren beeinflußt wird. Die Untersuchung soll damit zur Beantwortung der Frage beitragen, welcher hormonelle Regelmechanismus für die Anpassung der Alaninproduktion an die Bedürfnisse der Gluconeogenese, insbesondere für die gesteigerte Alaninfreisetzung im frühen Hungerzustand verantwortlich ist.

II. VERSUCHSPLANUNG

Die Einteilung der Versuchsreihen mit der entsprechenden Vorbehandlung der Tiere ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tab. 1

Allgemeine Vorbehandlung der Tiere: Bilaterale Adrenalektomie und gleichzeitige Streptozotocin-Applikation (ADX-DIAB) 6 Tage vor der Perfusion Haltung bei Standard-Kost mit 0,9 %iger NaCl-Lösung ad libitum		
Versuchsgruppe I: Monohormonale Effekte		
ADX-DIAB + NaCl (n=6) 4 1/2 Tage bis zur Perfusion: 0,05 ml physiol. NaCl-Lsg. s.c. 2 x tägl.	ADX-DIAB + B (n=7) 3 Tage bis zur Perfusion: morgens: 0,08 mg (≙0,02 ml) Betamethason s.c. abends: 0,20 mg (≙0,05 ml) Betamethason s.c.	ADX-DIAB + I (n=7) 4 1/2 Tage bis zur Perfusion: 2 x tägl. 3-4 U Insulin s.c. Dosierung je nach Blutglucosekonzentration
Versuchsgruppe II: Bihormonale Effekte		
ADX-DIAB + B + I (n=6) 4 1/2 Tage bis zur Perfusion: 2 x tägl. 3-4 U Insulin s.c. 3 Tage bis zur Perfusion: morgens: 0,08 mg (≙0,02 ml) Betamethason s.c. abends: 0,20 mg (≙0,05 ml) Betamethason s.c.	ADX-DIAB + B + I (n=4) 3 Tage bis zur Perfusion: morgens: 0,08 mg (≙0,02 ml) Betamethason s.c. abends: 0,20 mg (≙0,05 ml) Betamethason s.c. Zusatz von 0,5 mU Insulin / ml Medium 5 Min. vor Perfusionsbeginn	

In der ersten Versuchsgruppe (I) soll die hormonelle Regulation des Muskelstoffwechsels durch Glucocorticoide einerseits (ADX-DIAB + B) und durch Insulin andererseits (ADX-DIAB + I) nach mehrtägiger Applikation der Hormone untersucht werden. Um einen möglichen unspezifischen Effekt aufgrund der Injektionsbehandlung auszuschließen, wurde in einer Kontrollversuchsreihe adrenalektomiert-diabetischen Tieren physiologische Kochsalzlösung mit vergleichbarem Volumen und identischer Frequenz verabreicht (ADX-DIAB + NaCl).

Ziel der zweiten Versuchsgruppe (II) war die Darstellung der Interaktion der beiden Hormone auf muskulärer Ebene. Dazu wurde einerseits die Betamethasonbehandlung mit

in vivo-Insulinsubstitution kombiniert (ADX-DIAB + B + I), andererseits erfolgte im Anschluß an eine Betamethasonsubstitution in vitro-Zusatz von Insulin zum Perfusionsmedium (ADX-DIAB + B + i). Die letztgenannte Versuchsreihe stellt eine direkte Verbindung zu vorangegangenen Kurzzeit-Experimenten (ADX-DIAB + i) her (16).

III. MATERIAL UND METHODIK

A) Vorbehandlung der Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Albinoratten (Wistar II-Inzuchtstamm, Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf). Da für den Zeitpunkt der Perfusion ein einheitliches Körpergewicht von 180 - 190 g angestrebt wurde, das Gewichtsverhalten jedoch von der Art der Vorbehandlung abhing, ergaben sich für die einzelnen Versuchsreihen Ausgangsgewichte von 180 - 235 g.
Sechs Tage vor der Perfusion wurde in Hexobarbital-Narkose die bilaterale Adrenalektomie mit anschließender intraperitonealer Streptozotocin-Applikation durchgeführt. Das Diabetogenicum Streptozotocin wurde, wie bei RUDAS (77) beschrieben, in einer Dosierung von 100 mg/kg Körpergewicht in den linken Oberbauch injiziert.

In den folgenden Tagen bis zur Perfusion bestand die Ernährung in Standard-Diät (ALTROMIN 1314 Standard-Diät Ratten, Mäuse; Altromin Spezialfutterwerke GmbH, Lage) und 0,9 %iger Kochsalz-Lösung. Sämtliche Perfusionsversuche wurden mit gefütterten Tieren durchgeführt.

Zur Insulinsubstitution wurde das MC-Insulin Monotard^{R} aus der Gruppe der Intermediärinsuline verwandt. Es wurde zweimal täglich, morgens gegen 8 Uhr und abends gegen 18 Uhr, über 4 1/2 Tage bis zur Perfusion injiziert (Dosierung siehe Abschnitt IV, B). Die letzte Applikation erfolgte am Morgen des Perfusionstages etwa drei Stunden vor Perfusionsbeginn.

Als Glucocorticoid diente das Prednisolonderivat Betamethason. Eine Dosis von 5 mg Betamethason/kg Körpergewicht/Tag, wie sie bei Langzeitversuchen mit adrenalektomierten Tieren (83) angewandt wurde, erwies sich für die adrenalektomiert-diabetischen Ratten als nicht tolerierbar. Die Mehrzahl der Tiere verstarb innerhalb von fünf Behandlungstagen unter den Zeichen einer hochgradigen Katabolie, die mit hoher Ketonkörperausscheidung verbunden war.

Stattdessen erhielten die Tiere morgens 0,08 mg (≙ 0,02 ml) und abends - im Hinblick auf die nächtliche Nahrungsaufnahme - 0,20 mg (≙ 0,05 ml) Betamethason, was einer durchschnittlichen Dosis von 1,4 mg/kg/Tag entspricht. Zusätzlich mußte die Behandlungsdauer gegenüber den übrigen Versuchsreihen auf drei Tage beschränkt werden. Bei der kombinierten Behandlung mit Insulin und Betamethason beginnt daher die Applikation der beiden Hormone zu verschiedenen Zeitpunkten, um einen Vergleich mit der jeweiligen Einzelbehandlung zu ermöglichen.

B) Hinterkörperpräparation

Als Grundlage der Präparation des Rattenhinterkörpers für Perfusionszwecke diente im wesentlichen die Methode von RUDERMANN et al. (78), die im folgenden kurz dargestellt wird.

Die Versuchstiere wurden mit Hexobarbital (0,15 g Evipan^{R}-Na/kg Körpergewicht i.p.) narkotisiert und mit 0,2 ml Liquemin^{R} (≙ 1000 I.E. Heparin) heparinisiert.

Zur Darstellung des Operationssitus wurden die Bauchhöhle durch Medianschnitt eröffnet, die seitliche Bauchwand in Höhe der unteren Nierenpole ligiert und schließlich die Vasa spermatica und Ureteren abgebunden und durchtrennt.

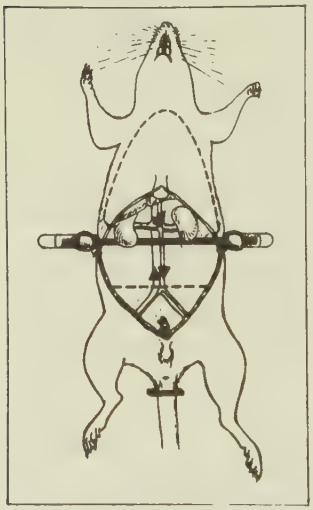
Die Evisceration des Beckens umfaßte das Absetzen des Urogenitalpaketes mit Vesica urinaria, Testes, Epididymides, Vesiculae seminales und Prostata. Das Colon descendens wurde nach Unterbindung und Durchtrennung der Arteria mesenterica inferior distal durchtrennt. Nach Ligatur und Abtrennung von Truncus coeliacus und Arteria mesenterica superior, Vena portae und Ductus choledochus sowie Ösophagus wurden Magen, Darm und Milz entfernt. Die tiefen epigastrischen Gefäße, die Vasa iliolumbalia sowie die Vasa vertebralia wurden unterbunden und durchtrennt.

Nach der Ligatur von Aorta und Vena cava wurde durch Entfernen der vorderen Thoraxwand ein Pneumothorax erzeugt. Anschließend wurde die Aorta mit einer Braunüle^{R} 0,5

(B. Braun, Melsungen) kanüliert und die Spitze vor der Bifurkation fixiert. Danach wurde das Präparat an das nicht-rezirkulierende Vorperfusionssystem angeschlossen. Nach Beginn der Vorperfusion erfolgte die Kanülierung der hyperämischen Vena cava mit einer Braunüle^{R} 1,0, deren Spitze ebenfalls vor der Bifurkation fixiert wurde.

Das Hinterkörperpräparat wurde mittels einer Metallstange caudal der unteren Nierenpole abgeklemmt und die Präparation durch Abklemmung des Schwanzes beendet. Nach der Vorperfusion mit 70 ml Medium erfolgte der Anschluß an das rezirkulierende Hauptperfusionssystem.

Abb. 1a



Schematische Darstellung des isolierten Hinterkörperpräparates

Die Pfeile bezeichnen den arteriellen Zufluß und den venösen Abfluß. Der perfundierte Bereich befindet sich distal der gestrichelten Linie.
Die Abklemmung des Oberkörpers und des Schwanzes verhindert den Verlust von Perfusionsmedium in diese Bezirke.

C) Perfusionsmedium

Die Zusammensetzung des Perfusionsmediums zeigt die folgende Tabelle 2:

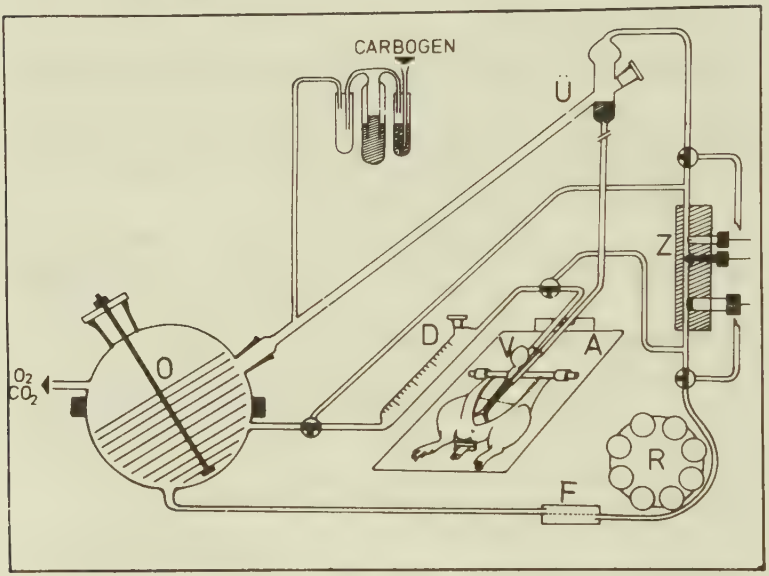
Bestandteile	Konzentrationen	Präparate und Art der Vorbereitung
KREBS-RINGER-Bicarbonat-Puffer, pH 7,38 (KRB-Puffer)	mVal/l K^+ 5,94 Na^+ 143,52 Ca^{++} 5,08 Mg^{++} 2,10 Cl^- 130,70 $H_2PO_4^-$ 1,19 HCO_3^- 24,76	15-minütige Begasung mit CARBOGEN (95 % O_2 / 5 % CO_2)
Rindererythrocyten als Hämoglobinträger	10 g/100 ml Hb Hämatokrit ~28 %	1 - 2 Tage alte Rindererythrocyten: zweimal mit 0,9%iger NaCl-Lösung, zweimal mit KRB-Puffer gewaschen
Rinderserum-Albumin	4 g/100 ml	COHN Fraction V -PENTEX/MILES: in KRB-Puffer gelöst - zweimal 24 Std. gegen KRB-Puffer dialysiert
Heparin	5000 USPE/100 ml	LIQUEMIN 25000 - HOFFMANN-LA ROCHE
D-(+)-Glucose	11 mM	α-D-Glucose p.A. - SERVA 22700
Pyruvat-Na	0,15 mM	MERCK 6619
L-(+)-Lactat	0,7 - 1,5 mM	aus den Erythrocyten

Nach dem Einbringen von 170 ml Perfusionsmedium in das Perfusionssystem wurde der pH-Wert durch Zusatz von $NaHCO_3$ auf pH 7,35 - 7,45 eingestellt. Anschließend wurden 70 ml zur Ausspülung des Präparates (= nicht-rezirkulierende Vorperfusion) entnommen.

Bei der Versuchsreihe mit Insulinzusatz zum Medium (ADX-DIAB + B + i) wurde das Altinsulinpräparat Actrapid^R in einer Konzentration von 0,5 mU Insulin/ml hinzugefügt.

D) Perfusionssystem

Abb. 1b Schematische Darstellung des Perfusionssystems

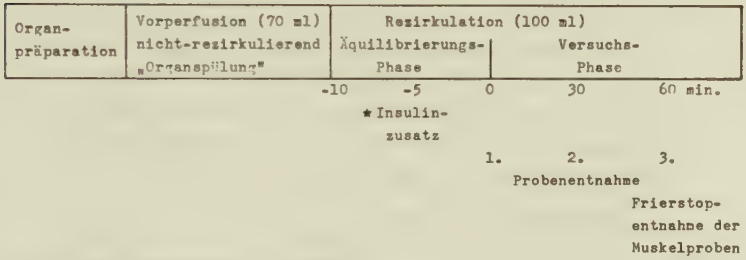


Durch Installation der Perfusionsapparatur innerhalb einer Perfusionskammer wurde die Temperatur konstant bei 37°C gehalten. Der Weg des Perfusionsmediums in dem geschlossenen Rezirkulationssystem war folgender:

- Scheibenoxygenator (O) mit
  a) Zufuhr von angefeuchtetem Carbogen (95 % O_2, 5 % CO_2)
  b) Anschluß an Vakuumpumpe (Unterdruck 1 - 2 cm H_2O-Säule)
  c) Kurzschlußverbindung zum Überlaufgefäß (Ü)
- Filter (F)
- Rollenpumpe (R)
- Durchflußelektrode zur pH- und pO_2-Kontrolle (Z)
- Überlaufgefäß (Ü)
  Infolge konstanter Einpegelung des Überlaufspiegels Einstrom mit konstantem hydrostatischem Druck von 80 mm Hg in das
- Hinterkörperpräparat
- Durchflußmesser (D)
- Scheibenoxygenator (O)

E) Perfusionsablauf

Der Ablauf der Perfusion ist schematisch dargestellt in Abb. 1c



★nur in der Versuchsreihe: ADX-DIAB + B + i

Nach dem Anschluß des Versuchspräparates an das rezirkulierende Hauptperfusionssystem dienten die ersten 10 Minuten der postoperativen Erholung und der Äquilibrierung des Präparates mit dem semisynthetischen Medium. Der Stoffwechsel während der folgenden 60-minütigen Versuchsphase wurde durch nachstehend aufgeführte Parameter erfaßt:

- Metabolitenkonzentration im Medium
  (Probenentnahme nach 0, 30, 60 min.)
- pH, pO_2 und Mediumdurchfluß
  (Messung nach 0, 15, 30, 45, 60 min.)
- Sauerstoffgehalt im Medium
  (arterieller und venöser O_2-Gehalt, jeweils nach 15 ± 5 min. und 45 ± 5 min.)
- Metabolitenkonzentration im Muskel
  (Frierstopentnahme beider Mm. gastrocnemii nach 60 min.)

F) Reagentien

1. Diabetogenicum:
   Streptozotocin (N-d-Glucosyl-(2)-N'-nitrosomethyl-harnstoff) = STR
   Streptozotocin A grade; Calbiochem GmbH, Gießen
   - Konzentration der STR-Lösung: 40 mg STR/ml eisgekühltem Citrat-Puffer, pH 4,5 (Herstellung aus 0,1 N HCl und 0,1 M Na_3-Citrat)
   - Dosierung von STR: 100 mg STR/kg Körpergewicht, i.p.

2. Insulin
   a) Zur Langzeit-Substitution:
      Monotard^R 40 I.E./ml
      Monocomponent (MC-) Insulin
      Insulin-Zink-Suspension von Schweine-Insulin, pH 7
      NOVO INDUSTRIE GmbH, Pharmaceutika, Mainz
   b) Als in vitro-Zusatz:
      Actrapid^R 40 I.E./ml
      Lösung von MC-Schweine-Insulin, pH 7

3. Synthetisches Glucocorticoid:
   Betamethason (9α-Fluor-16ß-methyl-prednisolon) als Dinatriumphosphat
   Celestan^R solubile; BYK-ESSEX, München

4. Narkoticum
   Hexobarbital-Natrium (Natrium-Salz der Methyl-cyclohexenyl-methyl-barbitursäure)
   Evipan^R-Natrium; Bayer AG, Leverkusen

5. Anticoagulans
   Natrium-Heparinat
   Liquemin^R 25000 (5 ml = 25000 I.E.)
   Hoffmann - La Roche AG, Grenzach-Wyhlen

G) Analysenmethodik

1. Perfusatproben
   Die Proben wurden durch vorgelegte Perchlorsäure deproteinisiert, zentrifugiert und der saure Überstand mit 2 N KOH (Lactat, Alanin, Glutamat/Glutamin) oder mit 0,7 M K_3PO_4 (Pyruvat) neutralisiert.
   a) Glucose
      Bestimmung aus dem sauren Überstand mit der Glucose-oxidase-Methode (GOD-Perid, Testkombination 15756, Boehringer Mannheim GmbH) nach WERNER et al. (94).

      Parallel dazu direkte Bestimmung in den entnommenen Perfusatproben mit einem Glucose-Analysator (YSI 23A Glucose Analyser, Yellow Springs Instr., Schlag, Bergisch-Gladbach).
   b) Pyruvat
      Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase (Testkombination 15973, Boehringer Mannheim GmbH) nach CZOK & LAMPRECHT (18).
   c) Lactat
      Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase nach GUTMANN & WAHLFELD (36).
   d) Alanin
      Bestimmung mit Alanin-Dehydrogenase nach WILLIAMSON (95).
   e) Glutamat/Glutamin
      Bestimmung von freiem Glutamat mit Glutamat-Dehydrogenase nach BERNT & BERGMEYER (7).
      Bestimmung von Glutamin nach LUND (50) als Differenz zwischen der Glutamatkonzentration nach Hydrolyse des Glutamins mit Glutaminase und der Konzentration an freiem Glutamat.

2. Muskelproben
   Von der Entnahme an wurden beide Mm.gastrocnemii in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt (Frierstop-entnahme). Der rechte M.gastrocnemius wurde danach mit einem Mikro-Dismembranator (B.Braun, Melsungen)

homogenisiert, mit 0,6 N Perchlorsäure extrahiert und schließlich zentrifugiert. Weitere Verwendung des sauren Überstandes für

a) Glucose-, Pyruvat-, Lactat-, Alanin-Bestimmung
Neutralisation und Bestimmung wie in den Perfusatproben

b) G-6-P/F-6-P
Titration des sauren Extraktes auf pH 3,5 mit 2 N KOH; Bestimmung mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Phosphoglucoseisomerase nach LANG & MICHAEL (47).

c) Citrat
Neutralisation und Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase und Citrat-lyase nach DAGLEY (19).

Der linke M.gastrocnemius diente zur Bestimmung der

d) Glykogenkonzentration
Auflösung des Gewebes mit 30 %iger KOH, Fällung des Glykogens mit Äthanol und 0,3 % LiCl, saure Hydrolyse des Glykogens und Bestimmung mit der Anthron-Methode nach SEIFTER et al. (84).

3. Messungen während der Perfusion

a) Durchflußrate
Der venöse Efflux wurde diskontinuierlich mit Hilfe eines graduierten Röhrchens gemessen; 10 ml/min. galten als unteres Limit für die Verwendbarkeit des Präparates.

b) Arterieller pH/pO_2
mit einer Durchflußelektrode (acid base digital analyser PHM 72, RADIOMETER, Kopenhagen).

c) Sauerstoffgehalt im Medium
Messung von arteriellem und venösem O_2-Gehalt direkt mit dem Analysator Lex-O_2-Con (LEXINGTON INSTRUMENTS CORP., Waltham, Mass., USA).

4. Kontrollen während Tierbehandlung in vivo

a) Blutglucosekonzentration

Das aus einer Schwanzvene gewonnene Blut wurde mit DEXTROSTIX^{R}-Teststäbchen (ames-diagnostica; MILES GmbH, Sparte AMES, Frankfurt) auf die Blutglucosekonzentration hin untersucht. Die Farbintensität der Reaktionszone wurde mit dem EYETONE^{R}- Reflektometer (Fa. MILES, Frankfurt) quantitativ bestimmt.

b) Ketonkörper im Urin

Zur Erfassung von Ketonkörpern im Urin diente der KETO-DIABUR-Teststreifen^{R} (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim). Der Nachweis beruht auf dem Prinzip der Probe nach Legal, bei der Acetessigsäure und Aceton mit Natriumnitroprussid einen violetten Farbkomplex ergeben. Die Farbstufen korrelieren mit der Acetessigsäure-Konzentration wie folgt:

neg. = unter 0,5 mmol/l
\+ = 0,5 - 4 mmol/l
++ = 4 - 10 mmol/l
+++ = über 10 mmol/l

H) Auswertung

1. Bilanzierung

Im Laufe der Perfusion werden bei 0', 30', 60', aus ursprünglich 100 ml Medium jeweils 7 ml als Probe entnommen. Bei der Bilanzierung kann davon ausgegangen werden, daß so gut wie die gesamte Stoffwechselaktivität des Hinterkörperpräparates der Muskulatur zuzuschreiben ist (78). Die Produktion bzw. Aufnahme der analysierten Metaboliten durch das Muskelpräparat während der 60-minütigen Perfusion berechnet sich, bezogen auf jeweils 30 g Hinterkörpermuskulatur, nach der folgenden Formel:

$$P_{0-60} = -A_{0-60} = \frac{KM_{30}}{KM} \times \left[V_1 (c_{30} - c_0) + V_2 (c_{60} - c_{30}) \right]$$

P_{0-60}, A_{0-60}: Produktion bzw. Aufnahme während der 60minütigen Perfusion in μmol x 30g Muskel^{-1} x 60min^{-1}

V_1 : Volumen während der ersten Perfusionshälfte (93ml)

V_2 : Volumen während der zweiten Perfusionshälfte (86ml)

c_i : Konzentration in μmol x ml^{-1} bei i Min.(i=0',30'60')

KM : Körpermasse des perfundierten Tieres in g

KM_{30} : Körpermasse in g eines Kollektivs von gleichbehandelten Tieren, die 30 g Hinterkörpermuskulatur aufweisen.

Der Sauerstoffverbrauch des Muskelpräparates wird nach dem Fick'schen Prinzip als Produkt aus Durchflußrate und arterio-venöser Differenz des Sauerstoffgehaltes berechnet.

Die Konzentration der Metabolite im Muskelzellwasser folgt der Beziehung (83):

$$c_I = \frac{c_M - (c_P \times 0{,}2 \text{ ml/g FG})}{(0{,}77 - 0{,}2) \text{ ml/g FG}}$$

mit $c_P = 1{,}11 \times c$

c = Konzentration im Perfusat in μmol x ml^{-1}

c_P = Konzentration im Plasmawasser in μmol x ml^{-1}

c_I = Konzentration im Intrazellulärwasser in μmol x ml^{-1}

c_M = Konzentration im Muskel in μmol x g Feuchtgewicht^{-1}

2. Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem t-Test nach Student (101) vorgenommen. Als Signifikanzschranke für den zweiseitigen Test wurde $p < 0{,}05$ gewählt. Das jeweilige Signifikanzniveau geht aus den Abbildungen bzw. dem zugehörigen Text hervor.
In den Abbildungen sind der Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung des Mittelwertes s_{EM} dargestellt.

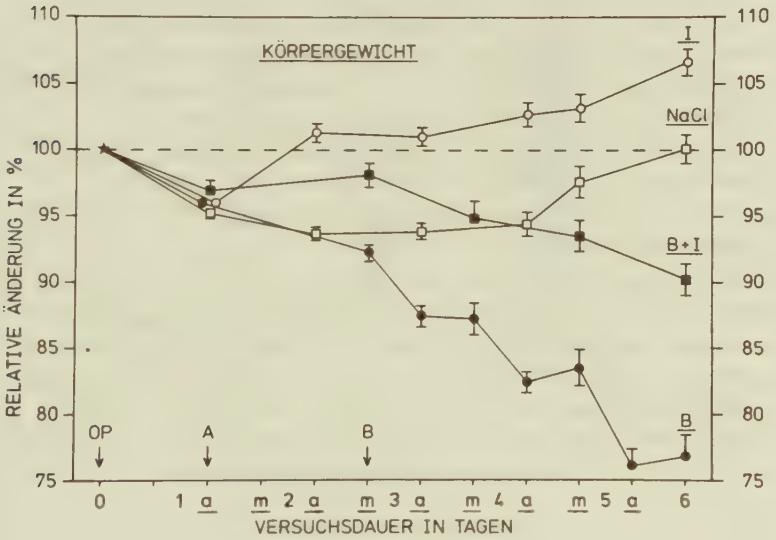
IV. ERGEBNISSE

in vivo-Untersuchungen

A) Gewichtsverhalten

Das Körpergewicht der Tiere während der Vorbehandlungsphase zeigte in dem 6-tägigen Beobachtungszeitraum - ausgedrückt in Prozent des Ausgangsgewichtes (= 100 %) - folgende Entwicklung (Abb. 2):

Abb. 2



OP = Adrenalektomie und STR- Applikation
A = Beginn der Behandlung mit NaCl bzw. Insulin (I)
B = Beginn der Behandlung mit Betamethason (B)

m = morgens
a = abends

Bedingt durch die Operation mit Adrenalektomie und Applikation des Diabetogenicums erleiden alle Tiere einen initialen Gewichtsverlust. Unter der Behandlung mit physiologischer Kochsalzlösung vom Abend des ersten Tages bis zum Morgen des sechsten Tages erfahren die Kontrolltiere (n = 23) einen Gewichtszuwachs von durchschnittlich 5,0 % des Ausgangsgewichtes.

Die mit Insulin substituierten Tiere (n = 18) steigern ihr Gewicht im gleichen Behandlungsintervall mit durchschnittlich 10,6 % um mehr als das Doppelte ($p < 0,001$ gegenüber Kontrolltieren).

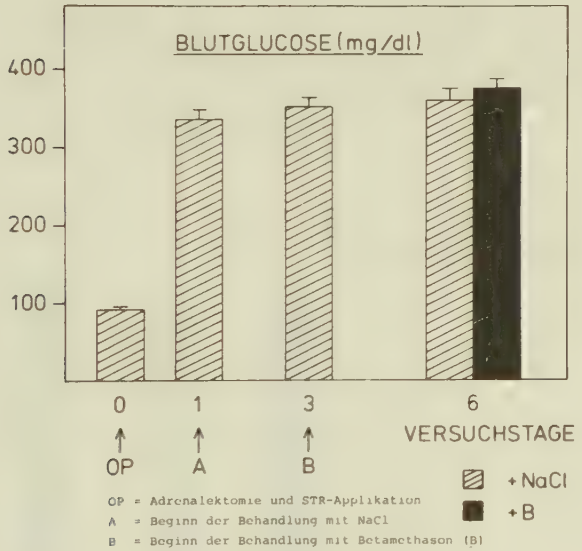
Dagegen tritt während der dreitägigen Betamethasonapplikation (n = 21) vom Morgen des dritten Tages bis zum Morgen des sechsten Tages ein mittlerer Gewichtsverlust von 15,4 % ein ($p < 0,001$ gegenüber Kontrolltieren). In diesem Tierkollektiv fällt weiterhin die Stabilität des Körpergewichtes während der nächtlichen Nahrungsaufnahme auf, wohingegen die Tiere tagsüber trotz einer zweieinhalbfach geringeren Dosis über 5 % ihres Ausgangsgewichtes verlieren.

Bei der bihormonalen Vollsubstitution (n = 17) bewirkt die am Abend des ersten Tages beginnende Insulingabe, daß die Gewichtseinbuße während der später einsetzenden dreitägigen Betamethasonbehandlung fast um die Hälfte auf durchschnittlich 7,9 % vermindert wird ($p < 0,001$ gegenüber alleiniger Betamethasonapplikation).

B) Blutglucosekonzentration

Einen Tag nach der Streptozotocin-Applikation beträgt die Blutglucosekonzentration im Schwanzvenenblut bei den Kontrolltieren durchschnittlich 336 mg/dl. Während der folgenden Behandlungsphase wird dieses Blutglucoseniveau beibehalten.

Abb. 3

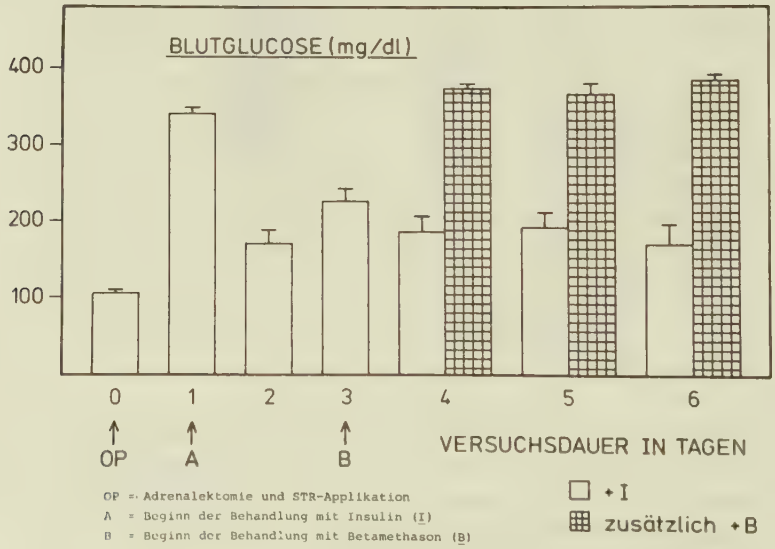


Nach dreitägiger Betamethasonbehandlung ist kein zusätzlicher Glucocorticoideffekt auf die erhöhte Blutglucosekonzentration zu erkennen: Am Perfusionstag findet sich keine nennenswerte Steigerung der Blutglucosekonzentration gegenüber den Kontrolltieren (Abb. 3).

Während der alleinigen Insulinsubstitution (Versuchsreihe: ADX-DIAB + I; Versuchsreihe: ADX-DIAB + B + I bis Tag 3)

wurden im Mittel morgens 3 I.E. Insulin und abends 4 I.E. Insulin verabreicht. Um die im Einzelfall notwendige Dosis zu bestimmen, wurde vor jeder Injektion die Blutglucosekonzentration ermittelt. Der Meßzeitpunkt fällt damit in das Ende der Wirkphase der vorangegangenen Injektion. Die Blutglucosewerte während alleiniger Insulinsubstitution liegen daher zum Meßzeitpunkt im Mittel wieder um 200 mg/dl (Abb. 4); sie sind aber signifikant niedriger als die entsprechenden Kontrollwerte der mit NaCl behandelten Tiere ($p < 0{,}001$). Die Effektivität der Insulinsubstitution zeigt sich weiterhin darin, daß in einer Reihe von Stichprobenmessungen ($n = 12$) 3 Stunden nach der Injektion erheblich niedrigere Werte 40 ± 5 mg/dl ($\bar{x} \pm s_{EM}$) gefunden wurden.

Abb. 4

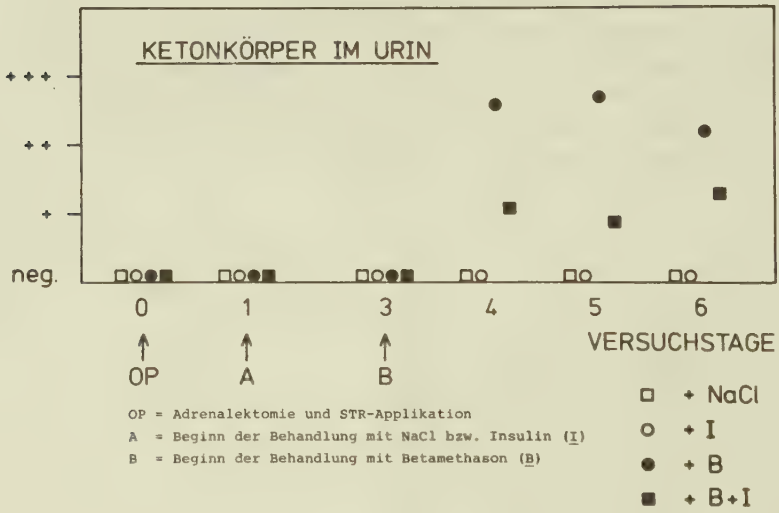


Ein Glucocorticoideffekt auf das Blutzuckerverhalten zeigt sich bei der bihormonalen Substitutionsbehandlung: Nach zusätzlicher Betamethasongabe steigt die morgens und abends gemessene Blutglucosekonzentration schon nach dem ersten Behandlungstag auf durchschnittlich über 366 mg/dl (Abb. 4) an. Diese Werte liegen signifikant höher als die entsprechenden Werte nach alleiniger Insulinsubstitution ($p < 0{,}001$). Die Uniformität der Blutglucosekonzentrationen zum Meßzeitpunkt ermöglichte den Übergang auf ein einheitliches Dosierungsschema (morgens: 3 I.E., abends 4 I.E. Insulin). Die Wirkung des Insulins wurde in einigen Stichprobenmessungen ($n = 5$) 3 Stunden nach der Injektion sichtbar: Mit 106 ± 20 mg/dl ($\bar{x} \pm s_{EM}$) wurden zu diesem Zeitpunkt normoglykämische Werte erreicht.

C) Ketonkörper im Urin

Während der Applikation von physiologischer NaCl-Lösung bzw. Insulinsubstitution tritt keine pathologisch erhöhte Ausscheidung von Ketonkörpern mit dem Urin auf (Ketonkörper negativ).

Abb. 5



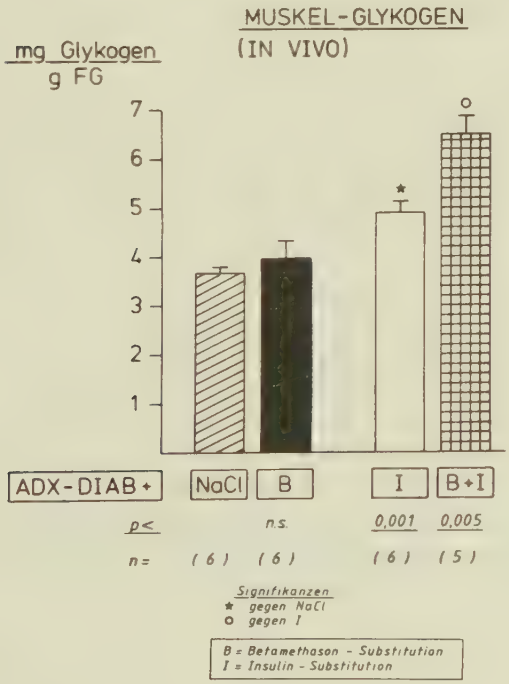
Nach Gabe von Betamethason setzt eine massive Ketonurie ein, die schon 10 Stunden nach der ersten Steroidapplikation deutlich ausgeprägt ist. Die Effizienz der zusätzlichen Insulinbehandlung manifestiert sich in einer deutlichen Milderung der glucocorticoidbedingten Ketonurie.

D) in vivo-Muskelglykogen (M.gastrocnemius)

Zum Vergleich mit dem in vitro-Muskelglykogengehalt nach 60-minütiger Perfusion wurden in vivo-Muskelproben auf ihren Glykogengehalt hin untersucht (Abb. 6). Sie wurden nach Hexobarbital-Narkose im Frierstopverfahren entnommen.

Betamethasonbehandlung führt bei adrenalektomiert-diabetischen Ratten zu keiner Veränderung im Glykogengehalt des M.gastrocnemius gegenüber der Kontrollbehandlung. Jedoch erfährt die signifikant ausgeprägte Erhöhung des Glykogengehaltes nach Insulinbehandlung ($p < 0{,}001$ gegenüber Kontrollbehandlung) durch zusätzliche Betamethasongabe eine weitere signifikante Steigerung ($p < 0{,}005$ gegenüber Insulinbehandlung). Diese Akzentuierung des Insulineffektes durch Betamethason wird auch in den noch darzustellenden in vitro-Untersuchungen beobachtet.

Abb. 6



in vitro-Untersuchungen

A) Angaben zum Hinterkörperpräparat

Die Relation der Muskelmasse des Hinterkörpers zur Gesamtmasse des Tieres (Tab. 3) hängt von der Art der Vorbehandlung ab und geht in die Berechnung der Umsatzraten (S. 16) ein.

Tab. 3

Versuchsreihe		Relation: Muskelmasse des Hinterkörpers/ Körpermasse	KM_{30}: Körpermasse mit 30g Hinterkörper-Muskulatur
ADX-DIAB	(n = 5)	1 : 6,00	180 g
ADX-DIAB + NaCl	(n = 5)	1 : 6,33	190 g
ADX-DIAB + B	(n = 5)	1 : 6,83	205 g
ADX-DIAB + I	(n = 5)	1 : 6,00	180 g
ADX-DIAB + B + I	(n = 4)	1 : 6,17	185 g

Angaben als Mittelwerte von n Tieren

Die Relation wurde bei allen Tieren am 6. Tage nach der Operation bestimmt. Sie beträgt für adrenalektomiert-diabetische Ratten, die keiner Behandlung unterlagen, 1 : 6,00. Nach Insulinsubstitution bleibt diese Relation erhalten.

Nach der Behandlung mit Betamethason ist die Relation deutlich zuungunsten der Muskelmasse verschoben, da das Muskelgewebe von der Gewichtseinbuße (Abb. 2) unter der Behandlung in stärkerem Maße als die anderen Körpergewebe betroffen ist. Die zusätzliche Insulingabe bei kombinierter Hormonbehandlung kann den überproportionalen Verlust an Muskelgewebe weitgehend aufhalten.

Der Wassergehalt der Muskulatur langfristig behandelter adrenalektomiert-diabetischer Ratten beträgt in vivo

75,55 % ± 0,82 ($\bar{x} \pm s_{EM}$; n = 20). während der 60-minütigen Perfusion trat keine Wassereinlagerung in das Muskelgewebe auf; für den Wassergehalt der Muskulatur nach der Perfusion ergab sich 76,18 % ± 1,32 ($\bar{x} \pm s_{EM}$; n = 30).

B) Kontrollparameter der Perfusion

Die Kontrollparameter der Perfusion in den einzelnen Versuchsreihen sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Tab. 4

Versuchsreihe	Zeit min	n	pH (arteriell)	pO_2 (arteriell) mm Hg	Durchflußraten ml/min	Trockengewicht %
ADX-DIAB + NaCl	0	6	7,376 0,021 0,008	433,0 54,9 22,4	14,6 1,8 0,7	
	60		7,347 0,025 0,010	343,6 83,3 34,0	14,1 2,2 0,9	22,49 1,59 0,65
ADX-DIAB + B	0	7	7,387 0,023 0,009	456,6 65,4 24,7	14,4 0,9 0,4	
	60		7,354 0,031 0,012	370,1 46,0 17,4	15,7 2,5 0,9	23,67 0,73 0,27
ADX-DIAB + I	0	7	7,378 0,027 0,010	441,5 64,4 24,3	15,1 1,7 0,6	
	60		7,347 0,019 0,007	333,7 74,7 28,2	14,5 2,2 0,8	24,13 0,53 0,22
ADX-DIAB + B + I	0	6	7,379 0,026 0,011	488,0 36,5 14,9	12,9 0,9 0,4	
	60		7,335 0,032 0,013	376,0 44,1 18,0	12,5 1,2 0,5	25,37 0,85 0,35
ADX-DIAB + B + i	0	4	7,377 0,016 0,008	459,2 50,8 25,4	16,5 2,7 1,4	
	60		7,339 0,040 0,023	385,7 29,9 17,2	16,3 2,7 1,4	23,23 0,58 0,29

Der geringfügige Abfall des Medium-pH während der Perfusion kann auf die kontinuierliche Lactat- und Aminosäurefreisetzung zurückgeführt werden.

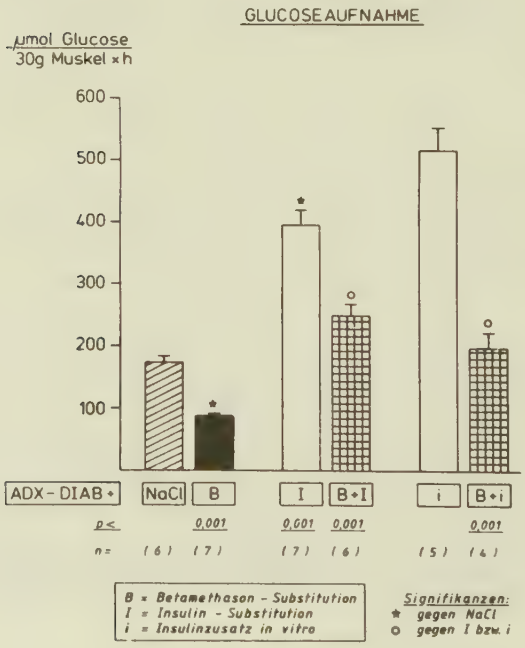
Ein arterieller Sauerstoffpartialdruck von 300 - 500 mmHg während der gesamten Perfusion garantierte bei einem relativ konstanten, mittleren Durchfluß von 14 ml Medium/min. durch das Hinterkörperpräparat eine ausreichende Sauerstoffversorgung.

C) Glucose

1. Aufnahmerate während der Perfusion

Nach einer mehrtägigen Kontrollbehandlung mit physiologischer Kochsalzlösung nimmt die Skelettmuskulatur adrenalektomiert-diabetischer Ratten während der 60-minütigen Perfusion etwa 175 µmol Glucose/30 g Muskelgewebe auf (Abb. 7).

Abb. 7



Dreitägige Betamethasonbehandlung reduziert diese Aufnahmerate statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$) um rund 50 %. Die mehrtägige Substitutionsbehandlung mit Insulin führt während der Perfusion zu einer hochsignifikanten Steigerung ($p < 0,001$) der Glucoseaufnahme gegenüber der Kontrollbehandlung auf mehr als das Doppelte.

Kombinierte Substitutionsbehandlung mit Glucocorticoid und Insulin führt zu einer mittleren Aufnahmerate, die sich von den Aufnahmeraten nach partieller Substitution jeweils signifikant unterscheidet ($p < 0,001$). Die Verminderung des Effektes der Insulinsubstitution auf die Glucoseaufnahmerate durch gleichzeitige Betamethasonbehandlung korreliert mit der oben (Abb. 4) dargestellten Beobachtung einer verminderten Insulinwirkung auf die Blutglucosekonzentration nach zusätzlicher Betamethasongabe.

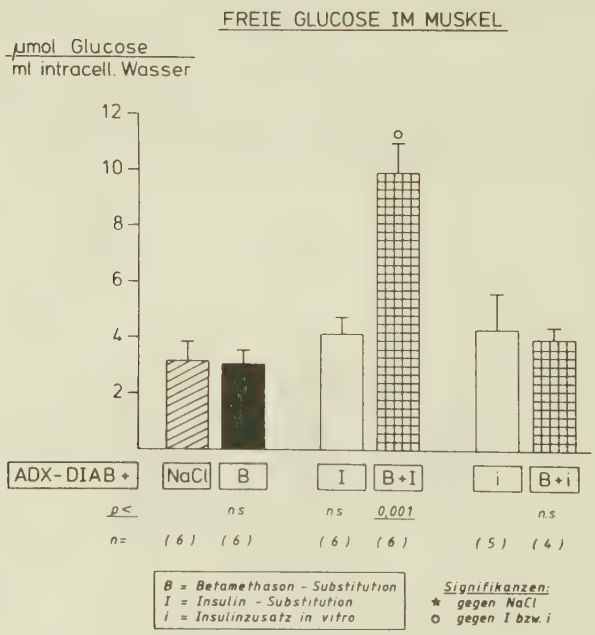
Weiterhin wird auch die erhöhte Glucoseaufnahmerate unter in vitro-Insulinzusatz durch vorhergehende Betamethasonbehandlung stark reduziert ($p < 0,001$).

2. Konzentration freier Glucose im M.gastrocnemius

Der post perfusionem bestimmte Glucosegehalt im Muskelzellwasser ist nach dreitägiger Betamethasonbehandlung gegenüber der Kontrollbehandlung unverändert (Abb. 8). Insulinsubstitution führt zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg.

Die Kombination der Betamethasonbehandlung mit Insulinsubstitution resultiert in einer erheblichen Erhöhung des intracellulären Glucosegehaltes: Es besteht ein Äquilibrium mit der extracellulären Glucosekonzentration am Perfusionsende. Bei Kombination der Betamethasonbehandlung mit in vitro-Insulinzusatz tritt dieses Phänomen nicht auf.

Abb. 8



D) Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat im M.gastrocnemius

Diese Phosphorylierungsprodukte der Glucose, die über eine Isomerasereaktion im Gleichgewicht miteinander stehen, weisen ein weitgehend ähnliches Reaktionsmuster auf (Abb. 9 und 10); weiterhin sind Parallelen zum Verhalten des intracellulären Glucosegehaltes vorhanden:

Nach dreitägiger Betamethasonbehandlung zeigen der G-6-P- und F-6-P-Gehalt im M.gastrocnemius nach 60-minütiger Perfusion eine Tendenz zur Abnahme gegenüber der Kontrollbehandlung (n.s.). Insulinsubstitution bewirkt einen leichten, hier signifikant ausgeprägten Anstieg verglichen mit der Kontrollbehandlung (G-6-P: $p < 0,01$; F-6-P: $p < 0,05$).

Kombinierte Substitutionsbehandlung führt - trotz einer beträchtlichen Reduktion der Glucoseaufnahme verglichen mit alleiniger Insulinsubstitution - nicht zu einer Verringerung des Muskelgehaltes der beiden Phosphorylierungsprodukte, im Falle des F-6-P sogar zu einer leichten Erhöhung ($p < 0,05$). Bei dem Vergleich ADX-DIAB + i / ADX-DIAB + B + i geht die Verringerung der Glucoseaufnahme mit dem Abfall dieser beiden Muskelmetabolite parallel (G-6-P: $p < 0,001$; F-6-P: $p < 0,02$).

Abb. 9

G-6-P-GEHALT IM MUSKEL

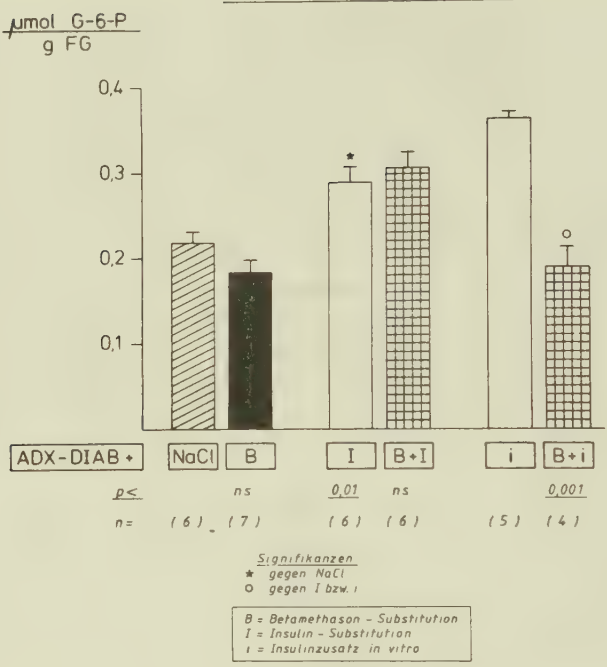
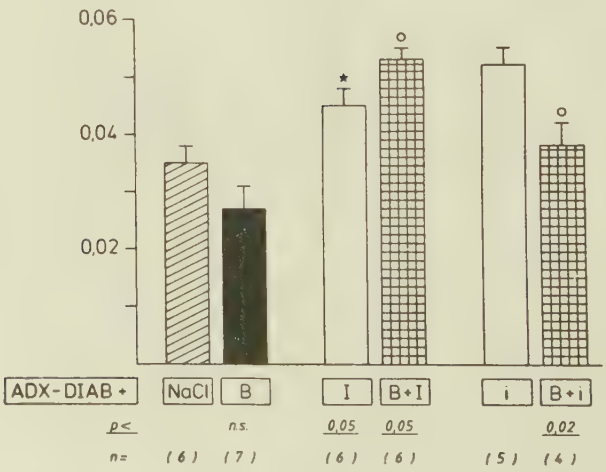


Abb. 10

F-6-P-GEHALT IM MUSKEL



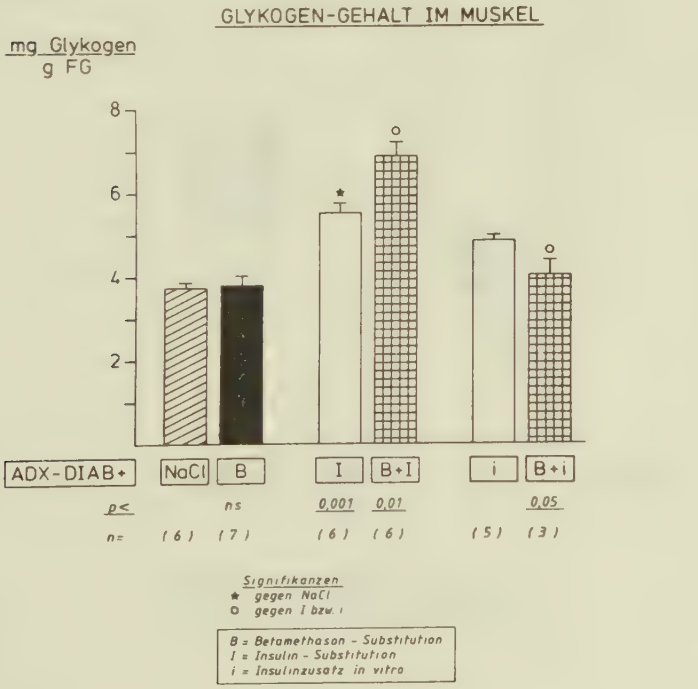
E) Glykogen im M.gastrocnemius

Die Befunde zum Glykogengehalt im M.gastrocnemius nach der Perfusion (Abb. 11) entsprechen den Befunden in vivo (Abb. 6).

Alleinige Betamethasonbehandlung vermag bei adrenalektomiert-diabetischen Ratten - im Gegensatz zu rein adrenalektomierten Ratten (93) - keine Steigerung des Muskelglykogengehaltes gegenüber Kontrollbehandlung hervorzurufen. Der Effekt der Insulinsubstitution auf den Glykogengehalt post perfusionem ist hochsignifikant ($p < 0{,}001$).

Durch zusätzliche Betamethasonapplikation (ADX-DIAB + B + I) wird, wie in vivo, die Wirkung alleiniger Insulinbehandlung akzentuiert ($p < 0{,}01$).

Abb. 11



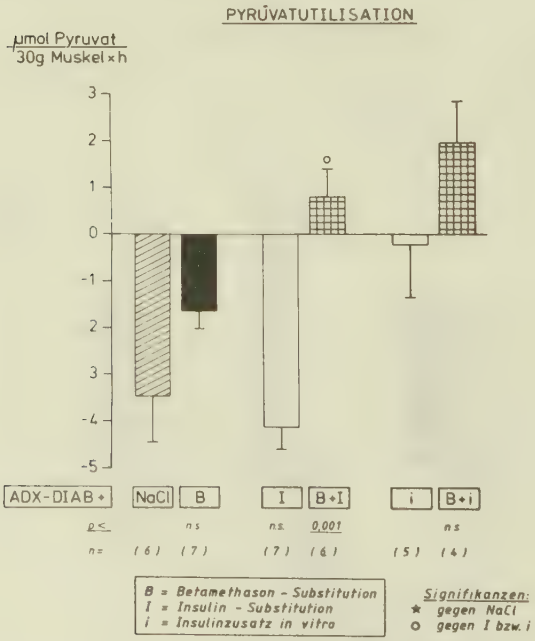
F) Pyruvat

1. Utilisationsrate während der Perfusion

Bei den Kontrolltieren ist eine Extraktion von Pyruvat aus dem Perfusionsmedium zu beobachten (Abb. 12). Auch nach alleiniger Betamethasonvorbehandlung bzw. Insulinsubstitution wird Pyruvat von der Muskulatur aufgenommen.

Bei der Kombination dieser beiden Vorbehandlungsformen ergibt sich in der Bilanz jedoch ein Pyruvatausstrom aus der Muskulatur. Eine Abgabe von Pyruvat an das Medium zeigt sich ebenfalls bei Perfusionen mit glucocorticoidvorbehandelten Tieren, bei denen Insulin zum Medium hinzugesetzt wurde.

Abb. 12

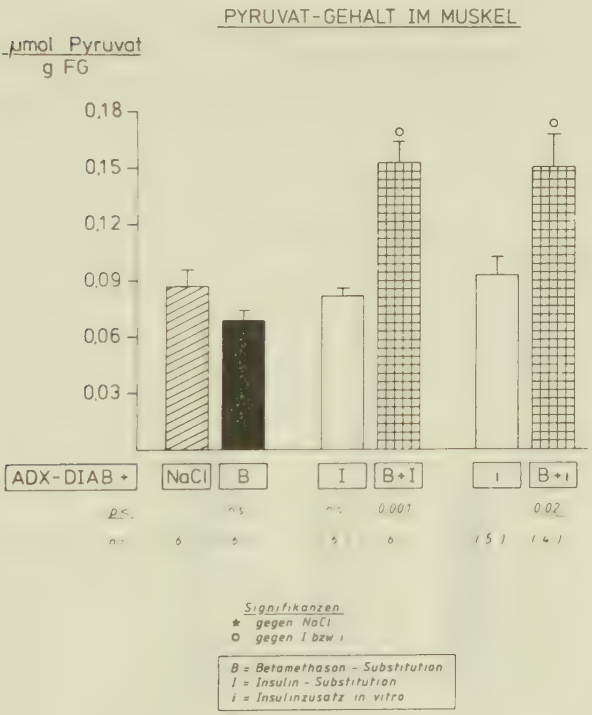


2. Konzentration im M.gastrocnemius

Die Pyruvatkonzentration im Muskel nach der Perfusion (Abb. 13) korreliert mit der Utilisationsrate während der Perfusion:

In den Versuchsreihen, in denen Pyruvat an das Medium abgegeben wird (Abb. 12), ist der Pyruvatgehalt im Muskel deutlich erhöht.

Abb. 13



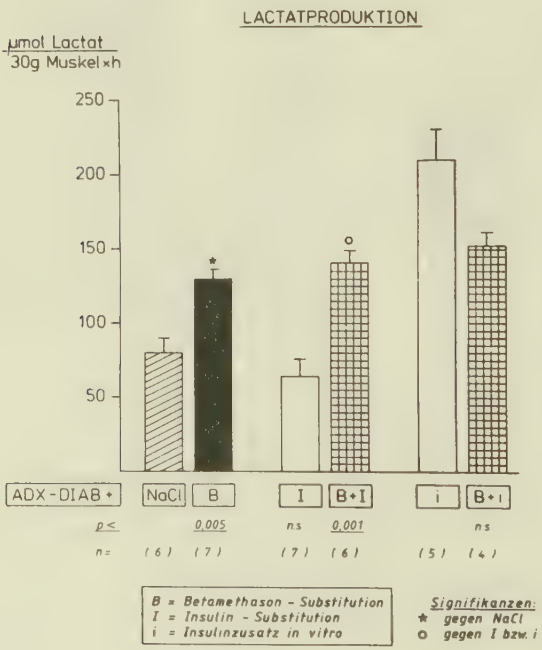
G) Lactat

1. Freisetzungsrate während der Perfusion

Betamethasonvorbehandlung bewirkt eine signifikante Steigerung ($p < 0{,}005$) der Lactatproduktion während der Perfusion gegenüber der Kontrollbehandlung (Abb. 14). Dagegen wird die Lactatfreisetzung während der Perfusion nach langfristiger Insulinsubstitution nicht erhöht, wohl aber durch kurzfristigen Insulinzusatz in vitro (16).

Bihormonale Substitution führt - bedingt durch die zusätzliche Betamethasonbehandlung - gegenüber alleiniger Insulinbehandlung zu einer signifikanten Erhöhung der Lactatbildung ($p < 0{,}001$).

Abb. 14

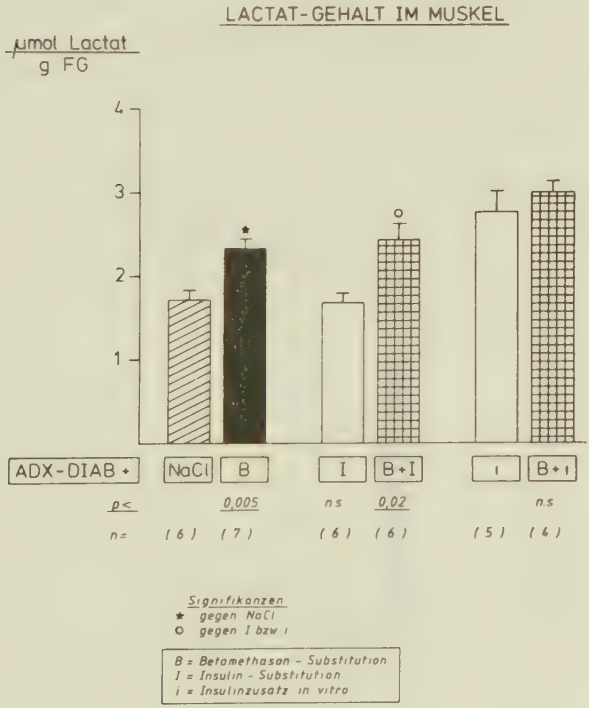


2. Konzentration im M.gastrocnemius

Die Lactatkonzentration im Muskel nach der Perfusion (Abb. 15) geht mit der Höhe der Freisetzungsraten während der Perfusion parallel:

Hohe Freisetzungsraten (Abb. 14) korrelieren mit erhöhten Lactatkonzentrationen im Muskel; signifikante Unterschiede der Lactatfreisetzung gehen mit signifikanten Unterschieden der muskulären Lactatkonzentration einher (ADX-DIAB + NaCl/ADX-DIAB + B: $p < 0{,}005$; ADX-DIAB + I/ADX-DIAB + B + I: $p < 0{,}02$).

Abb. 15



H) Lactat/Pyruvat-Quotient im Muskel

Der muskuläre Lactat/Pyruvat-Quotient kann als Anhalt für die cytoplasmatischen Redoxverhältnisse gelten (80). In der folgenden Tabelle sind die Quotienten aus den Konzentrationen der beiden Metabolite im Intracellulärwasser des M.gastrocnemius am Ende der Perfusion angegeben:

Tab. 5

Lactat/Pyruvat-Quotienten im Muskel

	NaCl	B	I	B + I
n	6	7	6	6
$\bar{x}$	18,9	36,0	20,5	16,5
s_{EM}	2,7	2,9	2,0	3,7

Es fällt eine hochsignifikante ($p < 0,005$) Erhöhung des muskulären Lactat-Pyruvat-Quotienten auf das Doppelte des Kontrollwertes nach Betamethasonvorbehandlung auf, während die Quotienten bei den übrigen Vorbehandlungsformen im Normbereich liegen.

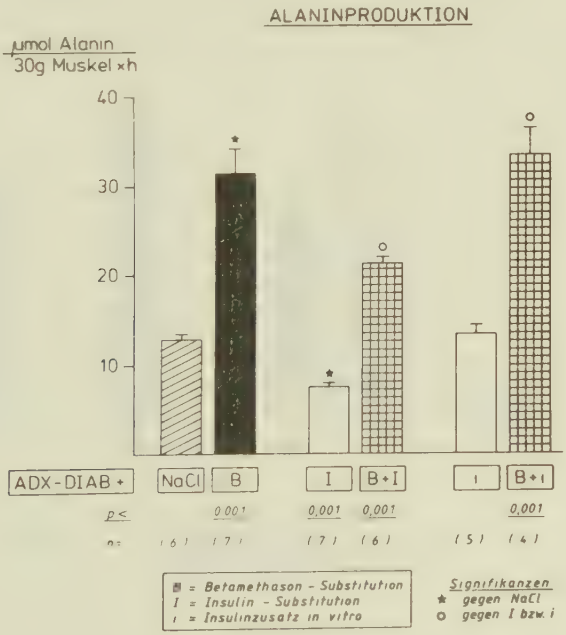
I) Alanin

1. Freisetzungsrate während der Perfusion

Die Alaninfreisetzungsrate während der Perfusion beläuft sich bei adrenalektomiert-diabetischen Ratten nach der NaCl-Kontrollbehandlung auf rund 13 µmol/30 g Muskulatur (Abb. 17). Alleinige Glucocorticoidvorbehandlung läßt die Alaninproduktion durch die Muskulatur auf mehr als das Doppelte ansteigen ($p < 0{,}001$). Alleinige Insulinsubstitution hat den entgegengesetzten Effekt und reduziert die Alaninfreisetzung gegenüber der Kontrollreihe beinahe um die Hälfte ($p < 0{,}001$).

Bihormonale Substitution ergibt eine mittlere Produktionsrate, die als Resultante der beiden Einzeleffekte anzusehen ist und von den beiden Extremwerten auch statistisch signifikant zu unterscheiden ist (ADX-DIAB + B + I : $p < 0{,}01$ gegenüber ADX-DIAB + B ; $p < 0{,}001$ gegenüber ADX-DIAB + I).

Abb. 17



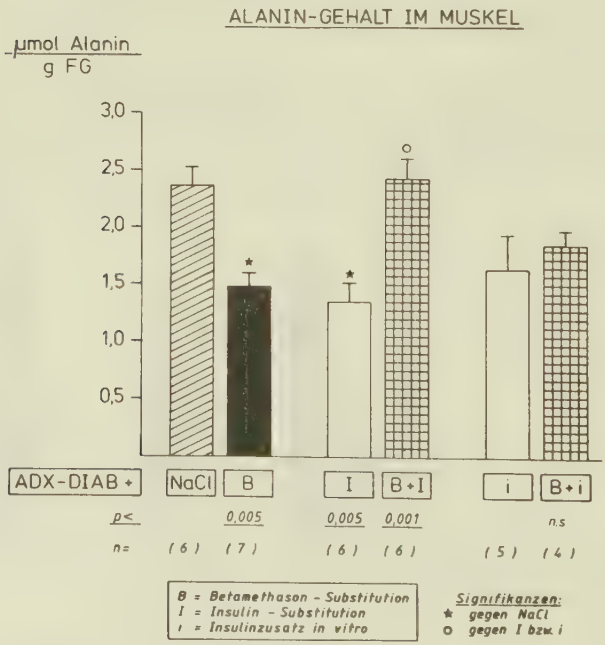
Insulinzusatz zum Medium vermag die Steigerung der muskulären Alaninfreisetzungsrate durch Betamethason nicht zu beeinflussen (ADX-DIAB + B + i / ADX-DIAB + B : n.s.).

2. Konzentration im M.gastrocnemius

Sowohl Steroidapplikation als auch Insulinsubstitution haben beide einen signifikanten Abfall des Alaningehaltes im Muskel zur Folge (jeweils $p < 0{,}005$), obwohl sie auf die Freisetzungsraten einander konträre Effekte ausüben.

Kombinierte Gabe der beiden Hormone resultiert in einer erhöhten muskulären Alaninkonzentration, die wieder im Bereiche des Kontrollwertes liegt (jeweils $p < 0{,}001$ gegenüber isolierter Substitution).

Abb. 18



Während die Konzentrationen an Alanin im Muskel post perfusionem nach Insulinsubstitution bzw. Betamethasonbehandlung gleich niedrig sind, unterscheiden sich die Alanin-Konzentrationsgradienten über die Zellmembran (Tab. 6). Angegeben sind die Quotienten aus den Konzentrationen im Intracellulärwasser (c_I) und Plasmawasser (c_p); alle Angaben beziehen sich auf das Ende der 60-minütigen Perfusion. Die Konzentrationsgradienten für Alanin am Ende der Perfusion stimmten in vorangegangenen Untersuchungen (83) recht gut mit den in vivo-Werten überein.

Tab. 6

Alanin-Konzentrationsgradienten (c_I : c_p)

	NaCl	B	I	B + I	i	B + i
n	6	7	6	6	5	4
$\bar{x}$	16,8	5,5	12,8	12,2	11,1	6,1
s_{EM}	1,1	0,4	1,0	0,8	1,8	0,6

Nach Betamethasongabe, nicht jedoch nach Insulinsubstitution, ist der Abfall der muskulären Alaninkonzentration (Abb. 18) mit einer weitgehenden Abnahme des transmembranösen Konzentrationsgradienten verbunden, der in der Regel einen Wert über 10 zugunsten des intracellulären Alanins aufweist.

Bei Kombination der beiden Hormonbehandlungen wird der normale Konzentrationsgradient wiederhergestellt.

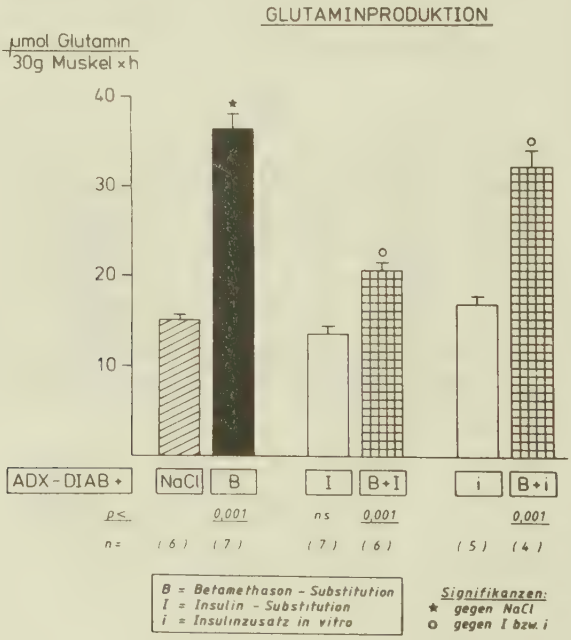
K) Glutaminfreisetzung während der Perfusion

Die Glutaminfreisetzungsrate der Kontrolltiere hat mit rund 15 µmol/30 g Muskulatur (Abb. 19) die gleiche Größenordnung wie die des Alanins.

Dreitägige Vorbehandlung mit Betamethason führt auch bei Glutamin zu einer Steigerung der Freisetzungsrate auf mehr als das Zweifache des Kontrollwertes ($p < 0{,}001$). Anders als im Falle des Alanins vermag alleinige Insulinsubstitution die Abgabe von Glutamin durch die Muskulatur nicht signifikant zu reduzieren.

Jedoch ist die Glutaminbildung in der Kombination von Insulin- und Glucocorticoidgabe gegenüber alleiniger Steroidbehandlung deutlich verringert ($p < 0{,}001$). Durch Insulinzusatz zum Perfusionsmedium läßt sich auch beim Glutamin die Steigerung der Freisetzungsrate durch Betamethasonvorbehandlung nicht unterdrücken (ADX-DIAB + B + i / ADX-DIAB + B : n.s.).

Abb. 19



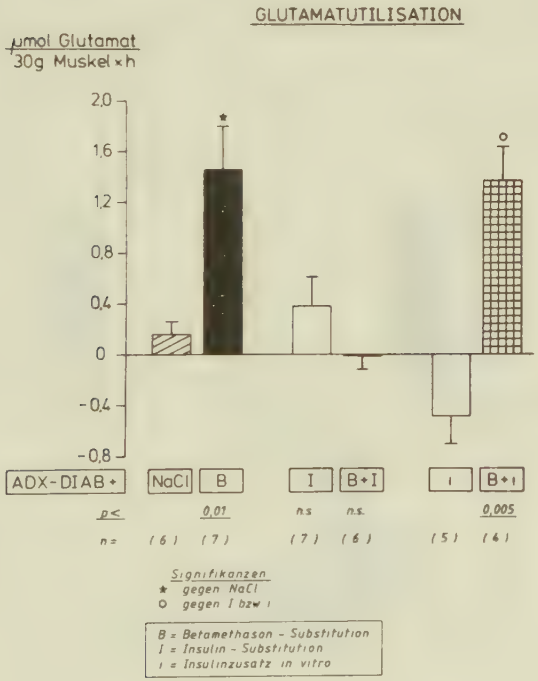
L) Glutamatfreisetzung während der Perfusion

Alleinige Betamethasonvorbehandlung steigert die Glutamatfreisetzung während der Perfusion ($p < 0,01$).

Alleinige Insulinsubstitution hat keinen Effekt auf die Glutamatbildung. Bei kombinierter Hormongabe dagegen wird der Betamethasoneffekt aufgehoben.

Insulinzusatz zum Medium kann auch im Falle des Glutamats die Freisetzungssteigerung durch Steroidbehandlung nicht verhindern.

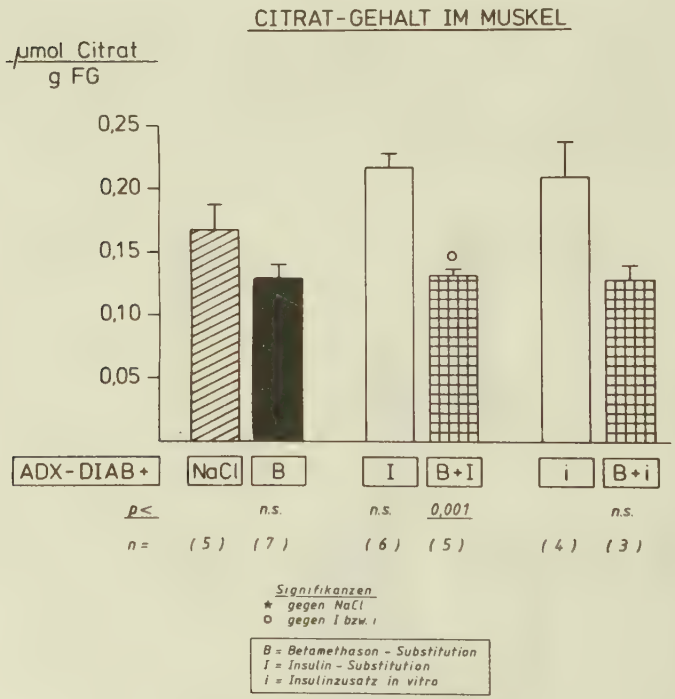
Abb. 20



M) Citratkonzentration im M.gastrocnemius

Die Citratkonzentration im M.gastrocnemius nach der Perfusion weist bei den Versuchsreihen, die eine Vorbehandlung mit Betamethason erfuhren, fast identische Werte auf. Gegenüber der jeweiligen, betamethasonfrei vorbehandelten Vergleichsreihe ist der muskuläre Citratgehalt erniedrigt, in einem Falle statistisch signifikant (ADX-DIAB + B + I / ADX-DIAB + I : $p < 0{,}001$).

Abb. 21



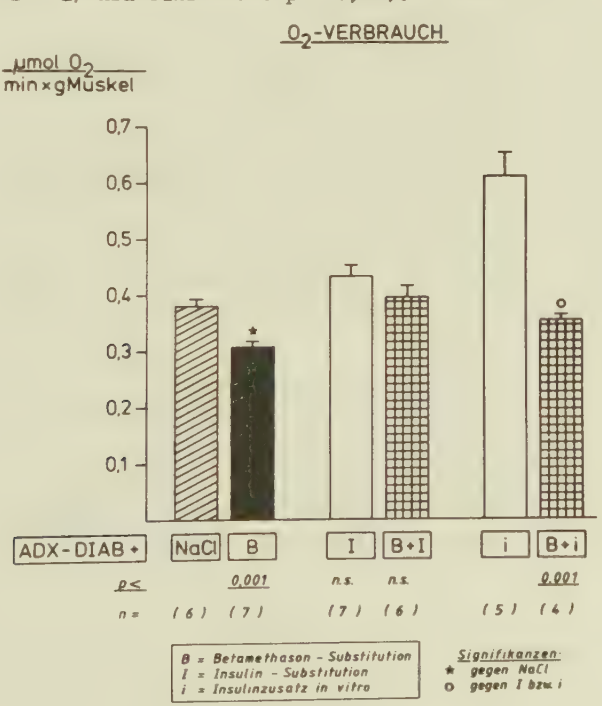
N) Sauerstoffverbrauch während der Perfusion

Die unterschiedliche Vorbehandlung der Tiere bewirkt auch Unterschiede im Sauerstoffverbrauch während der Perfusion (Abb. 22):

Alle Versuchsreihen, bei denen während der Vorbehandlungsphase Betamethason verabreicht wurde, weisen niedrigere O_2-Aufnahmeraten auf als die betamethasonfrei vorbehandelten Vergleichsreihen. Dieser Unterschied ist in zwei Fällen signifikant (ADX-DIAB + NaCl / ADX-DIAB + B : $p < 0{,}001$; ADX-DIAB + i / ADX-DIAB + B + i : $p < 0{,}001$).

Durch zusätzliche Insulinsubstitution bzw. in vivo-Applikation von Insulin wird der Sauerstoffverbrauch gegenüber alleiniger Steroidmedikation signifikant gesteigert (ADX -DIAB + B + I / ADX-DIAB + B : $p < 0{,}005$; ADX-DIAB + B + i/ ADX-DIAB + B : $p < 0{,}02$).

Abb. 22



Zusammenfassung der Ergebnisse

Nach mehrtägiger Behandlung adrenalektomiert-diabetischer Ratten mit Betamethason und/oder Insulin ergeben sich zusammenfassend folgende Effekte auf den in vitro-Stoffwechsel der Muskulatur während 60-minütiger Hinterkörperperfusion:

a) durch Betamethasonbehandlung
   1. Reduktion der Glucoseaufnahme um 50 %
   2. Konzentration von Glucose, Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat im Muskel nicht erhöht
   3. Glykogengehalt im Muskel nicht erhöht
   4. Steigerung der Lactatfreisetzung
   5. Vermehrte Freisetzung von Alanin, Glutamin, Glutamat
      Erniedrigte Alaninkonzentration im Muskel bei vermindertem transmembranösem Konzentrationsgradienten
   6. Citratkonzentration im Muskel nicht erhöht
   7. Verringerung des Sauerstoffverbrauches

b) durch Insulinsubstitution
   1. Steigerung der Glucoseaufnahme über 100 %
   2. Vermehrung des Glykogengehaltes im Muskel
   3. Verminderte Freisetzung nur von Alanin, nicht von Glutamin und Glutamat
      Erniedrigte Alaninkonzentration im Muskel bei normalem transmembranösem Konzentrationsgradienten

c) durch bihormonale Substitution
   1. Verringerung der Glucoseaufnahme gegenüber alleiniger Insulinsubstitution
   2. Erhebliche Akkumulation freier Glucose im Muskel
   3. Erhöhung des Glykogengehaltes im Muskel gegenüber alleiniger Insulinsubstitution

4. Pyruvatabgabe an das Perfusionsmedium zusammen mit vermehrter Lactatfreisetzung gegenüber alleiniger Insulinsubstitution
5. Verminderte Freisetzung von Alanin, Glutamin, Glutamat gegenüber alleiniger Betamethasonbehandlung

d) durch Insulinzusatz zum Perfusionsmedium bei betamethasonvorbehandelten Tieren
   1. Verringerung der Glucoseaufnahme um 60 % gegenüber nicht betamethasonvorbehandelten Tieren
   2. Keine Verminderung der gesteigerten Alaninproduktion

Tabellenanhang

Blutglucosekonzentrationen (mg/dl) während der Vorbehandlungsphase in vivo

Tab. 7

Versuchsreihe	Messzeitpunkt in Tagen											
	0	1		2		3		4		5		6
		a		m	a	m	a	m	a	m	a	m
ADX-DIAB + NaCl n = 23	23 91 ± 25	23 336 ± 53					23 253 ± 49			(17) 341 ± 31		(8) 260 ± 46
ADX-DIAB + B n = 21	21 106 ± 21	21 350 ± 42					(14) 253 ± 37					(9) 278 ± 25
ADX-DIAB + I n = 18	35 106 ± 22	35 340 ± 46		70 171 ± 143		53 226 ± 118		36 187 ± 118		36 193 ± 119		18 170 ± 106
ADX-DIAB + B + I n = 17							17 276 ± 107	(26) 273 ± 35		(16) 366 ± 56		(15) 385 ± 25

Angaben in der Reihenfolge n, $\bar{x}$, $s_{\bar{x}}$

(n): Stichprobenmessungen bei geringer Streuung der Blutglucosekonzentration

m = morgens, a = abends

Adrenalektomie und STH-Applikation: Tag 0

Beginn der Behandlung mit NaCl bzw. Insulin: Tag 1, abends

Beginn der Behandlung mit Betamethason: Tag 3, morgens

Da die Vorbehandlung in den Versuchsreihen ADX-DIAB + I sowie ADX-DIAB + B + I bis zum Morgen des dritten Tages identisch verlief, wurden die Meßwerte dieser beiden Versuchsreihen entsprechend zusammengefaßt. Die morgens und abends ermittelten Daten wurden zu einem Tagesmittelwert zusammengezogen. Diese Angaben gelten ebenfalls für die Darstellung der Blutglucosekonzentrationen in Abb. 3 und 4.

Substratumsatzraten
während der Hinterkörperperfusion

Angegeben sind die Kumulativen in µmol / 30 g Muskel x h.

Tab. 8

	ADX-DIAB + ...					
	+ NaCl	+ B	+ I	+ B + I	+ i	+ B + i
Glucose	6 - 174,62 21,73 8,87	7 - 87,72 12,73 4,81	7 - 396,69 61,98 23,43	6 - 249,19 44,14 18,02	5 - 515,13 84,13 37,62	4 - 198,12 48,96 24,48
Pyruvat	6 - 3,48 2,38 0,97	7 - 1,65 1,01 0,38	7 - 4,13 1,23 0,46	6 + 0,79 1,50 0,61	5 - 0,22 2,54 1,14	4 + 1,94 1,75 0,88
Lactat	6 79,79 24,03 9,81	7 129,85 19,00 7,18	7 64,02 30,52 11,53	6 141,03 19,58 7,99	5 210,10 45,74 20,46	4 152,48 18,63 9,31
Alanin	6 12,84 1,59 0,65	7 31,45 7,45 2,81	7 7,53 0,98 0,37	6 21,36 1,70 0,70	5 13,42 2,19 0,98	4 33,49 6,05 3,02
Glutamin	6 15,20 1,19 0,49	7 36,45 4,53 1,71	7 13,72 2,03 0,77	6 20,72 2,01 0,82	5 17,00 2,04 0,91	4 32,18 3,87 1,94
Glutamat	6 + 0,155 0,265 0,108	7 + 1,464 0,895 0,338	7 + 0,376 0,621 0,235	6 - 0,009 0,262 0,107	5 - 0,488 0,492 0,220	4 + 1,270 0,538 0,269

Angaben in der Reihenfolge n, $\bar{x}$, s_x, s_{EM}
Die Werte der Versuchsreihe ADX-DIAB + i entstammen den vorangegangenen Kurzzeit-Experimenten (16).

Sauerstoffverbrauch während der Hinterkörperperfusion

Angegeben ist der Sauerstoffverbrauch in µmol O_2 / min x g Muskel während der beiden Perfusionshälften.

Tab. 9

Versuchsreihe	n	0' - 30'	30' - 60'	Mittlerer O_2-Verbrauch
ADX-DIAB	6	0,381	0,379	0,380
+ NaCl		0,043	0,041	0,031
		0,018	0,017	0,013
ADX-DIAB	7	0,290	0,326	0,308
+ B		0,029	0,037	0,025
		0,011	0,014	0,010
ADX-DIAB	7	0,436	0,427	0,432
+ I		0,066	0,063	0,055
		0,025	0,024	0,021
ADX-DIAB	6	0,409	0,378	0,394
+ B + I		0,054	0,053	0,049
		0,022	0,021	0,020
ADX-DIAB	5	0,634	0,585	0,610
+ i		0,090	0,103	0,095
		0,040	0,046	0,043
ADX-DIAB	4	0,366	0,340	0,353
+ B + i		0,061	0,062	0,020
		0,030	0,031	0,010

Die Werte der Versuchsreihe ADX-DIAB + i entstammen den vorangegangenen Kurzzeit-Experimenten (16).

Substratgehalt im M.gastrocnemius post perfusionem

(µmol / g Feuchtgewicht)

Tab. 10

	ADX-DIAB + ...					
	+ NaCl	+ B	+ I	+ B + I	+ i	+ B + i
Glucose	6	6	6	6	5	4
(µmol/ml intracell. Wasser)	3,17	3,06	4,16	9,91	4,30	3,94
	1,66	1,25	1,43	2,59	2,90	0,94
	0,68	0,51	0,58	1,06	1,30	0,47
G-6-P	6	7	6	6	5	4
	0,219	0,183	0,288	0,305	0,362	0,189
	0,030	0,041	0,043	0,047	0,018	0,045
	0,012	0,015	0,018	0,019	0,008	0,023
F-6-P	6	7	6	6	5	4
	0,035	0,027	0,045	0,053	0,052	0,038
	0,008	0,010	0,007	0,005	0,006	0,009
	0,003	0,004	0,003	0,002	0,002	0,004
Glykogen	6	7	6	6	5	3
(mg/g FG)	3,73	3,79	5,52	6,89	4,88	4,04
	0,34	0,64	0,59	0,83	0,27	0,62
	0,14	0,24	0,24	0,34	0,12	0,36
Pyruvat	6	6	6	6	5	4
	0,087	0,069	0,082	0,153	0,093	0,151
	0,021	0,013	0,010	0,027	0,022	0,035
	0,009	0,005	0,004	0,011	0,010	0,017
Lactat	6	7	6	6	5	4
	1,71	2,33	1,69	2,43	2,77	3,00
	0,28	0,33	0,27	0,52	0,53	0,26
	0,12	0,12	0,11	0,21	0,24	0,13
Alanin	6	7	6	6	5	4
	2,36	1,48	1,35	2,43	1,64	1,85
	0,43	0,30	0,40	0,41	0,67	0,27
	0,17	0,12	0,16	0,17	0,30	0,13
Citrat	5	7	6	5	4	3
	0,167	0,129	0,216	0,131	0,209	0,128
	0,045	0,029	0,028	0,010	0,054	0,019
	0,020	0,011	0,012	0,005	0,027	0,011

Angaben in der Reihenfolge n, $\bar{x}$, s_g, s_{EM}
Die Werte der Versuchsreihe ADX-DIAB + i entstammen den vorangegangenen Kurzzeit-Experimenten (16).

V. DISKUSSION

A) Glucoseutilisation unter Glucocorticoiden und Insulin

a) Glucocorticoidwirkungen

Als Ursache für den hyperglykämischen Effekt der Glucocorticoide am Gesamtorganismus wird neben der Steigerung der Gluconeogenese in der Leber auch eine Verminderung der Glucoseaufnahme in peripheren, extrahepatischen Organen diskutiert (60, 88). Eine glucocorticoidinduzierte Inhibition der Glucoseaufnahme ließ sich bisher für das Fettgewebe (59, 62), die Haut (66), für Lymphocyten (58) und Fibroblasten (34) verifizieren. Für die Skelettmuskulatur liegen kontroverse Befunde vor. Während in Inkubationsversuchen keine eindeutigen Hinweise auf eine derartige Aufnahmehemmung gewonnen werden konnten (12, 31, 76), zeigte sich bei Perfusionsexperimenten am isolierten Rattenhinterkörper, mit denen die Stoffwechselaktivität einer weitaus größeren Muskelmasse erfaßt werden kann, eine geringe, jedoch statistisch signifikante Reduktion der Glucoseaufnahme dreieinhalb Stunden nach einmaliger Gabe des Prednisolonderivates Betamethason (46, 83, 87). Betrug die Aufnahmeverminderung bei Verwendung adrenalektomierter Tiere bis zu 20 % gegenüber nicht glucocorticoidbehandelten Kontrolltieren, so erreichte sie bei adrenalektomiert-diabetischen Tieren sogar Werte von 50 % (16). Die deutlichere Ausprägung des Befundes bei adrenalektomiert-diabetischen gegenüber adrenalektomierten Tieren läßt eine partielle Maskierung des Glucocorticoideffektes bei adrenalektomierten Tieren durch endogenes Insulin vermuten.

In den eigenen Versuchen ist nach dreitägiger Betamethasonbehandlung die Glucoseaufnahmerate der Muskulatur adrenalektomiert-diabetischer Tiere, ebenso wie nach einmaliger Glucocorticoidgabe (16), auf die Hälfte des Kontrollwertes verringert (Abb. 7); dabei betrug die Gesamttagesdosis weniger als ein Drittel der in (16) einmalig applizierten Akutdosis.

Bei der Deutung der Glucoseaufnahmeminderung unter Glucocorticoiden ist zunächst an einen direkten Glucocorticoideffekt zu denken. Daneben besteht die Möglichkeit eines indirekten Glucocorticoideffektes: Die Hemmung der Glucoseaufnahme könnte auch durch die unter Betamethasonsubstitution auftretende Ketose (Abb. 5) erklärt werden, denn für Fettsäuren und Ketonkörper, die bei der Ketose in erhöhter Konzentration vorliegen, wird ebenfalls eine Glucoseaufnahmehemmung diskutiert. Wie später dargestellt werden soll, ist die in diesen Versuchen beobachtete Glucoseaufnahmehemmung nicht auf eine Erhöhung der Konzentrationen an Fettsäuren und Ketonkörpern während der Betamethasonbehandlung zurückzuführen, sondern eher auf eine direkte Glucocorticoidwirkung.

Das Auftreten einer Ketose nach Glucocorticoidbehandlung adrenalektomiert-diabetischer Tiere und das Fehlen jeglicher Ketonurie bei unbehandelten (16) bzw. mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten (Abb. 5) adrenalektomiert-diabetischen Kontrolltieren demonstriert die Bedeutung der Glucocorticoide für die Entwicklung einer Ketose bei Vorliegen eines Insulinmangels. Als Mechanismus dieses auch in klinischen Studien nachgewiesenen Glucocorticoideffektes (82) wird neben der durch Lipolysesteigerung erhöhten Konzentration an freien Fettsäuren, die von der Leber in Ketonkörper umgewandelt werden können, eine Verminderung der peripheren Ketonkörperutilisation diskutiert (26, 82).

Im folgenden soll die Bedeutung der oben angesprochenen Glucoseaufnahmehemmung durch Ketonkörper und Fettsäuren für diese Experimente näher untersucht werden. Sie wurde zuerst von RANDLE et al. (72) am perfundierten Rattenherzen beschrieben. Der Versuch, dieses nach RANDLE als „Glucose-Fettsäuren-Zyklus" bezeichnete Phänomen ebenfalls für die Skelettmuskulatur zu verifizieren, führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. RUDERMAN et al. (5, 33, 81) und REIMER et al. (74) konnten an der Muskulatur des isoliert

perfundierten Rattenhinterkörpers keinen Effekt von Fettsäuren oder Ketonkörpern auf die Glucoseaufnahme demonstrieren. RENNIE und HOLLOSZY (75) sahen dagegen unter Verwendung von rejuvenierten Erythrocyten und einer nicht-rezirkulierenden Perfusionsanordnung eine 30 %ige Glucoseaufnahmehemmung durch Ölsäurezusatz zum Perfusionsmedium mit einem bevorzugten Angriffspunkt in den „roten" Muskelfasern, die im Gegensatz zu den „weißen" Muskelfasern eine hohe Kapazität für die Oxidation von Fettsäuren aufweisen. Die Aufnahmehemmung wird dabei auf eine Hemmung der Glucosephosphorylierung zurückgeführt. Die postulierte Sequenz der Aufnahmehemmung in den „roten" Muskelfasern geht von einem Anstieg der Citratkonzentration aufgrund einer gesteigerten Fettsäureoxidation aus. Hierdurch soll eine Hemmung der Phosphofructokinase bewirkt werden, welche durch einen Aufstau von Glucose-6-Phosphat zur Rückkopplungshemmung der Hexokinase führt, so daß eine intracelluläre Akkumulation von Glucose und damit eine Reduktion der Glucoseaufnahme resultiert. Ein analoger Mechanismus wird auch für die Inhibition der Glucoseaufnahme durch Ketonkörper postuliert.

Der beschriebene Mechanismus spielt in den hier durchgeführten Versuchen jedoch keine Rolle; denn nach mehrtägiger Betamethasonbehandlung ist - entgegen den oben dargestellten Verhältnissen - die intracelluläre Glucosekonzentration im M.gastrocnemius (Abb. 8) gegenüber Kontrolltieren unverändert, Citrat-Gehalt (Abb. 21), Glucose-6-Phosphat-Gehalt (Abb. 9) und Fructose-6-Phosphat-Gehalt (Abb. 10) im Muskel sind sogar leicht, wenn auch nicht signifikant vermindert. Die Glucoseaufnahmehemmung der Muskulatur nach längerfristiger Glucocorticoidbehandlung beruht demnach auf einem anderen als dem für Fettsäuren und Ketonkörpern postulierten Mechanismus und kann daher nicht auf deren Konzentrationserhöhung bei der gleichzeitig vorhandenen Ketose zurückgeführt werden.

Da es nach der Glucocorticoidbehandlung zu keiner Anhäufung freier Glucose in den Muskelfasern kommt (Abb. 8), scheint nicht eine Phosphorylierungshemmung, sondern vielmehr eine Hemmung des vorgeschalteten Membrantransportes der Glucose für die Verringerung der Glucoseaufnahme durch Betamethason verantwortlich zu sein. Auch in Untersuchungen am Fettgewebe (17), am Thymusgewebe (60), an einem Mäuseohrstreifenpräparat (2, 52) sowie in den vorausgegangenen Perfusionsexperimenten zur Akutwirkung der Glucocorticoide auf die Skelettmuskulatur (16) wird das Glucose-Transportsystem in der Zellmembran als Angriffspunkt der Aufnahmehemmung betrachtet.

b) Modifikation der Wirkung von Insulinzusatz zum Perfusionsmedium durch Glucocorticoidvorbehandlung

Nach der Abklärung des Glucocorticoideffektes auf die basale Glucoseaufnahme der Skelettmuskulatur adrenalektomiert-diabetischer Tiere interessiert die Frage, inwieweit auch die insulinstimulierte Glucoseaufnahme durch Glucocorticoide beeinflußt werden kann. Ähnlich wie für das Fettgewebe (17, 62) liegen auch für den Herzmuskel (37, 57, 71) und das Diaphragma (76) Befunde über eine glucocorticoidbedingte Verminderung der Ansprechbarkeit des Glucose-Transportsystems gegenüber submaximaler Insulinstimulation vor. HENDERSON et al. (37) fanden am isoliert perfundierten Rattenherzen hypophysektomierter Tiere nach viertägiger Verabreichung von Hydrocortison eine verminderte Stimulation des Transportes des nichtmetabolisierbaren Glucoseanalogons Arabinose durch das dem Perfusionsmedium zugesetzte Insulin. Am Diaphragma konnten RIDDICK et al. (76) nach viertägiger Gabe von Hydrocortison eine Verringerung des Membrantransportes des Glucoseanalogons 2-Deoxyglucose unter Insulin nachweisen.

Im Gegensatz zu Herzmuskel und Zwerchfell ist dieses Phänomen an der sich nicht kontinuierlich kontrahierenden Skelettmuskulatur bisher nicht demonstriert worden. CHAUDRY et al. (12) konnten am inkubierten M.soleus durch

in vitro-Zusatz von Dexamethason zum Inkubationsmedium keinen hemmenden Effekt auf die insulinstimulierte Xyloseaufnahme nachweisen. Ebenso blieb in den vorangegangenen Perfusionsexperimenten an adrenalektomierten (87) wie auch an adrenalektomiert-diabetischen Ratten (16) die insulinstimulierte Glucoseaufnahme unbeeinflußt durch einmalige Betamethasongabe in vivo, dreieinhalb Stunden vor Perfusionsbeginn.

Demgegenüber zeigen die in dieser Untersuchung vorgelegten Ergebnisse (Abb. 7), daß die unter Insulinzusatz zum Perfusionsmedium stimulierte Glucoseaufnahme der Skelettmuskulatur nach längerdauernder, dreitägiger Behandlung mit Betamethason hochsignifikant reduziert ist. Auch unter diesen Bedingungen findet sich kein Hinweis auf eine Phosphorylierungshemmung in Form einer Akkumulation intracellulärer Glucose (Abb. 8), so daß wiederum die Inhibition des Membrantransportes durch das Glucocorticoid als Ursache für die Reduktion der Glucoseaufnahme anzusehen ist. Da Insulin seinerseits den Glucosetransport über die Muskelzellmembran stimuliert, ist das Ergebnis als Ausdruck des Antagonismus der beiden Hormone auf der Ebene des transmembranösen Glucosetransportes zu interpretieren.

Für den insulinantagonistischen Effekt der längerfristigen Glucocorticoidmedikation sind grundsätzlich zwei Mechanismen denkbar. Zum einen besteht die Möglichkeit einer Beeinträchtigung der Interaktion von Insulin mit dem Transportsystem, wobei insbesondere eine Reduktion der Zahl der Insulinreceptoren durch Glucocorticoide zu diskutieren ist. Entsprechende Versuche wurden bislang hauptsächlich an Fettzellen durchgeführt. OLEFSKY et al. (64) berichteten, daß sechstägige Dexamethasongabe in vivo eine Verringerung der Zahl der Insulinreceptoren in Leber- und Fettzellen normaler Ratten verursachte. In einer späteren Untersuchung (65) jedoch konnte dieser Effekt nach - allerdings nur kurzfristigem - in vitro-Zusatz von Dexamethason zum Inkubationsmedium nicht reproduziert werden. Daher wurde die Verminderung der

Receptorzahl in vivo als Folge der durch die Behandlung erhöhten Plasma-Insulinkonzentration diskutiert (62), die ihrerseits die Zahl der Insulinreceptoren vermindern kann (29). Ein derartiger, sekundärer, insulinvermittelter Glucocorticoid-Effekt könnte jedoch in den hier verwendeten diabetischen Tieren nicht auftreten. Dagegen gelang CIGOLINI et al. (14) kürzlich der Nachweis eines primären Glucocorticoideffektes im Sinne einer direkten Verminderung der Insulinreceptor-Dichte an humanen Fettzellen, die einer längerdauernden, einwöchigen Inkubation mit Hydrocortison ausgesetzt waren. Darüber hinaus wird von diesem Autor die Beteiligung anderer, nicht näher definierter Mechanismen an der Entstehung der glucocorticoidinduzierten Insulinresistenz gefordert.

Eine zweite Erklärungsmöglichkeit für die beschriebene Abschwächung des Insulineffektes auf die Glucoseaufnahme der Skelettmuskulatur besteht in der Annahme eines direkten negativen Einflusses der Glucocorticoide auf das Glucose-Transportsystem. Da Glucocorticoide die Proteinsythese hemmen (85, 88), könnte dieser Effekt in der verminderten Neuproduktion eines labilen Transportproteins bestehen. Die Verminderung der insulinstimulierten Glucoseaufnahme nach mehrtägiger Betamethasongabe ließe sich dann durch die Verringerung der einer Stimulation durch Insulin zur Verfügung stehenden Carrierzahl erklären. Eine Reduktion von Transportproteinen postulieren auch ZYSKOWSKI et al. (100) für die glucocorticoidbedingte Hemmung der Glucoseaufnahme in Thymocyten, ebenso KOSTYO et al. (45) für die Hemmung der muskulären Aminosäurenaufnahme durch Glucocorticoide.

Bei der Inhibition der muskulären Glucoseaufnahme nach kurzfristiger Betamethasonapplikation sind offenbar noch keine irreversiblen, reduktiven Veränderungen an den Insulinreceptoren bzw. am Transportsystem eingetreten, da der akute Glucocorticoideffekt durch Insulinzusatz zum Perfusionsmedium völlig überspielt wird (16, 87).

c) Insulinsubstitution

Mehrtägige Insulinsubstitution der adrenalektomiert-diabetischen Tiere führte zu einer Steigerung der muskulären Glucoseaufnahme um den Faktor 2,3 (Abb. 7), obwohl das Medium kein Insulin enthielt. Die Größenordnung der Stimulation der Glucoseaufnahme stimmt überein mit früheren Untersuchungen, in denen Insulin zum Perfusionsmedium hinzugegeben wurde (16, 74, 87, 89).

Die längerfristige in vivo-Applikation von Insulin in den hier durchgeführten Versuchen bewirkte diese Steigerung der Glucoseaufnahme trotz einer intensiven Organspülung vor Perfusionsbeginn. Die hierin zum Ausdruck kommende prolongierte Wirkung des Insulins konnten auch LEWIS et al. (48) unter Verwendung einer nicht-rezirkulierenden Perfusionsanordnung zeigen. Der Insulineffekt auf die Glucoseaufnahme während kurzfristiger Perfusion mit insulinhaltigem Medium war noch lange Zeit während der folgenden - einer Organspülung vergleichbaren - Perfusion mit insulinfreiem Medium nachzuweisen. Weitere Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Insulin ergaben, daß Insulin aus dem Hinterkörperpräparat während des insulinfreien Perfusionsabschnittes nur langsam verschwindet und lange im Muskelgewebe persistiert. Offensichtlich sind somit nach der Organspülung noch genügend Insulinreceptoren besetzt, um die Stoffwechselaktivität des Muskelpräparates zu beeinflussen.

d) Insulin- und Betamethasonsubstitution

Der Effekt der Insulinsubstitution in vivo auf die Glucoseaufnahme der Skelettmuskulatur wird bei zusätzlicher Betamethasonbehandlung deutlich vermindert (Abb. 7). Gleichzeitig tritt bei kombinierter Hormongabe ein Anstieg der intracellulären Glucosekonzentration um ein Mehrfaches auf (Abb. 8).

Die Aktivität der Hexokinase im Muskel ist größer als die unter physiologischen Bedingungen erreichbare Glucose-Transportrate, so daß es nicht zum Anstieg der intracellu-

lären Glucosekonzentration kommen kann und der Membrantransport den geschwindigkeitslimitierenden Schritt der Glucoseaufnahme darstellt (49, 55, 57). Dies trifft auch für die hohe Glucoseaufnahmerate unter alleiniger Insulinsubstitution zu (Abb. 8). Der Anstieg der intracellulären Glucosekonzentration bei der kombinierten Hormongabe deutet darauf hin, daß der Membrantransport die Phosphorylierungskapazität überschreitet, so daß die Phosphorylierung zur geschwindigkeitsbestimmenden Sequenz der Glucoseaufnahme wird. Als Ursache für die Verminderung der Glucoseaufnahme gegenüber alleiniger Insulinsubstitution ist demnach die Verminderung der Hexokinase-katalysierten Glucosephosphorylierung infolge der zusätzlichen Betamethasongabe anzusehen. Da die Glucoseaufnahmerate nun die Phosphorylierungsrate und nicht mehr die Transportrate widerspiegelt, können mögliche zusätzliche Veränderungen des Membrantransportes nicht beobachtet werden.

Eine Inhibition der Glucosephosphorylierung durch Corticosteroidgabe in vivo wurde auch in Untersuchungen am isoliert perfundierten Rattenherzen gefunden (56, 71). Als Ursache wird dabei ein indirekter Glucocorticoideffekt, nämlich eine Rückkopplungshemmung aufgrund erhöhter Fettsäurekonzentrationen im Sinne des oben beschriebenen „Glucose-Fettsäuren-Zyklus" diskutiert (71, 73, 88). In den am Hinterkörperpräparat durchgeführten Versuchen jedoch bewirkt die zusätzliche Betamethasongabe gegenüber alleiniger Insulinsubstitution keine signifikante Erhöhung der Glucose-6-Phosphat-Konzentration im Muskel (Abb. 9), wie sie bei diesem Mechanismus zu erwarten wäre. Die verminderte Hexokinaseaktivität bei kombinierter Hormonapplikation kann daher nicht durch eine Rückkopplungshemmung infolge erhöhter Konzentration des Reaktionsproduktes Glucose-6-Phosphat erklärt werden; vielmehr ist ein direkter negativer Glucocorticoideinfluß auf die Hexokinase im Sinne einer Verminderung der Enzymkonzentration wahrscheinlich. Da die Hexokinase andererseits durch Insulin stimuliert wird (4, 43), besteht auch auf der Ebene der Glucosephosphorylierung ein Antagonismus der beiden Hormone.

Die fehlende Manifestation der Phosphorylierungshemmung bei alleiniger Betamethasonsubstitution dürfte auf die stark verminderte Glucoseaufnahme zurückzuführen sein, die zu einer Demaskierung der verminderten Enzymaktivität nicht ausreicht.

Die Steigerung der intramuskulären Glucosekonzentration bei kombinierter Hormonsubstitution deutet auf eine unterschiedliche Ausprägung des Insulinantagonismus der Glucocorticoide bei zwei aufeinanderfolgenden Stoffwechselvorgängen hin: Die insulinantagonistische Glucocorticoidwirkung auf die Hexokinaseaktivität scheint die insulinantagonistische Glucocorticoidwirkung auf den Glucosemembrantransport zu übertreffen.

B) Glykogenumsatz unter Glucocorticoiden und Insulin

Zum Glykogenverhalten unter Glucocorticoiden liegen Befunde über eine Steigerung der Glykogendeposition in der Muskulatur 12 Stunden nach Cortisolgabe vor (3, 67, 70). In den Perfusionsexperimenten am Rattenhinterkörper bewirkte die längerfristige Betamethasonbehandlung bei adrenalektomierten Tieren ebenfalls eine Zunahme des muskulären Glykogengehaltes (93). Hingegen ergab die mehrtägige Betamethasonbehandlung der adrenalektomiert-diabetischen Tiere bei diesen Untersuchungen weder in vivo (Abb. 6) noch nach 60 minütiger Perfusion (Abb. 11) eine signifikante Veränderung im Glykogengehalt des M.gastrocnemius gegenüber den Kontrolltieren. Das Fehlen des Glucocorticoideffektes bei adrenalektomiert-diabetischen im Gegensatz zu adrenalektomierten Tieren demonstriert dessen Abhängigkeit von der Anwesenheit des Insulins und stützt somit die Hypothese (3), daß der Anstieg des Muskelglykogens 12 Stunden nach Cortisolapplikation durch die Erhöhung der Insulinkonzentration im Zuge der hormonellen Gegenregulation vermittelt wird.

Die mehrtägige Insulinsubstitution der adrenalektomiert-diabetischen Tiere bewirkt in vivo (Abb. 6) wie in vitro (Abb. 11) eine signifikante Zunahme der Glykogenkonzentration,

die auf eine Aktivierung der Glykogen-Synthetase zurückzuführen ist (13, 15).

Kombinierte Hormonbehandlung adrenalektomiert-diabetischer Tiere ergibt in vivo (Abb. 6) und in vitro (Abb. 11) eine weitere signifikante Steigerung der Glykogenkonzentration gegenüber alleiniger Insulinsubstitution. Aufgrund der oben dargestellten Befunde erscheint eine direkte Beeinflussung der Glykogensynthese durch die zusätzliche Glucocorticoidgabe als Erklärung sehr unwahrscheinlich, da alleinige Betamethasongabe keine Veränderung des Glykogengehaltes bewirkte. Vielmehr könnte die bei kombinierter Hormongabe ausgeprägte Steigerung der intramuskulären Glucosekonzentration (Abb. 8) von Bedeutung sein: Aus Untersuchungen an der Leber (8, 23, 39) ebenso wie an der Muskulatur des Diaphragmas (21, 40) ist bekannt, daß durch Glucose die Überführung der Glykogen-Phosphorylase a in ihre inaktive Form begünstigt wird.

C) Pyruvatutilisation

Die Pyruvatbilanz während der Perfusion wird im wesentlichen von zwei Faktoren bestimmt. Dabei ist zunächst der Pyruvatgradient zwischen Muskel und Medium zu nennen. Da die Pyruvatkonzentration im Medium zu Perfusionsbeginn über der Pyruvatkonzentration im Muskelzellwasser liegt, ist in der Regel eine Pyruvatextraktion aus dem Perfusionsmedium zu beobachten (46, 83). Darüber hinaus wird die Pyruvatbilanz in den einzelnen Versuchsreihen vom jeweiligen Verhältnis zwischen dem Pyruvatanstrom aus der Glykolyse sowie aus der intracellulären Pyruvatsynthese und dem Pyruvatabstrom in den oxidativen Stoffwechsel bestimmt. Eine Verringerung der Pyruvataufnahme, insbesondere eine Pyruvatabgabe an das Perfusionsmedium kann dabei als Hinweis auf eine relativ zum Anstrom verminderte Pyruvateinschleusung in den oxidativen Endabbau interpretiert werden, möglicherweise infolge einer Hemmung der Pyruvatdehydrogenase-Reaktion (46, 87).

Die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Kontrolltiere extrahieren - ebenso wie unbehandelte adrenalektomiert-diabetische Tiere (16) - während der Perfusion Pyruvat aus dem Perfusionsmedium. Betamethasonbehandlung bewirkt eine Minderung, Insulinsubstitution eine leichte Steigerung der Pyruvataufnahme gegenüber Kontrollbehandlung (Abb. 12).

Kombinierte Hormonbehandlung ergibt gegenüber der jeweiligen Einzelsubstitution eine signifikante Änderung der Pyruvatbilanz im Sinne einer Pyruvatabgabe an das Medium (Abb. 12), die sich im signifikanten Anstieg der Pyruvatkonzentration im Muskel (Abb. 13) widerspiegelt. Nach den obigen Ausführungen weist dieser Befund auf eine relativ zum Pyruvatanstrom verringerte Pyruvatoxidation hin. Die Steigerung der Lactatproduktion bei kombinierter Hormongabe (Abb. 14) läßt sich dabei als Folge einer vermehrten Umwandlung des akkumulierenden Pyruvats in Lactat interpretieren.

Während für Insulin eine Stimulation der Pyruvatoxidation belegt ist (49), wird für Glucocorticoide eine hemmende Wirkung diskutiert (88). Ein Hinweis auf eine glucocorticoidbedingte Hemmung der Pyruvatoxidation ergab sich auch bei früheren Perfusionsexperimenten am Hinterkörperpräparat, bei denen nach einmaliger Betamethasongabe eine verminderte Bildung von $^{14}CO_2$ aus radioaktiv markierter Glucose auftrat (46, 83).

Somit stellt sich die Frage, wie das Pyruvatverhalten bei kombinierter Hormongabe unter dem Einfluß der beiden antagonistischen Hormone zu erklären ist. Offensichtlich übertrifft die insulinantagonistische Glucocorticoidwirkung auf die Pyruvatoxidation die oben dargestellte insulinantagonistische Glucocorticoidwirkung auf Hexokinase und Glucosemembrantransport, so daß es zur intramuskulären Pyruvatakkumulation und damit zum Pyruvatausstrom aus der Muskulatur kommt.

Die im Perfusionsexperiment demonstrierte glucocorticoidbedingte Pyruvatverwertungsstörung der Muskulatur korreliert gut mit der auch klinisch beschriebenen Erhöhung des Plasma-Pyruvatspiegels am Gesamtorganismus nach Steroidgabe (38, 44).

D) Lactatfreisetzung

Im Vordergrund der folgenden Betrachtungen soll der Einfluß der Glucocorticoide auf die Lactatfreisetzung stehen. Dabei fällt auf, daß die Lactatproduktion der mit Betamethason behandelten Tiere gegenüber den Kontrolltieren signifikant erhöht ist (Abb. 14), obwohl die Glucoseaufnahme um die Hälfte reduziert gefunden wurde (Abb. 7). Entsprechend der erhöhten Lactatfreisetzung steigt auch der nach der Perfusion bestimmte Lactatgehalt im M.gastrocnemius signifikant an (Abb. 15); hierbei ist der muskuläre Pyruvatgehalt eher vermindert (Abb. 13). Daraus ergibt sich eine signifikante Zunahme des muskulären Lactat/Pyruvat-Quotienten (Tab. 5) auf fast das Doppelte des Kontrollwertes. Der Quotient wird als Spiegelbild der cytosolischen Redoxverhältnisse interpretiert (80). Die Verschiebung des Lactat-Pyruvat-Quotienten zugunsten von Lactat entspricht dabei einer Erhöhung des cytoplasmatischen NADH/NAD^+-Quotienten. Der so abgeleitete erhöhte NADH-Anfall unter Betamethason wird möglicherweise durch eine verminderte Reoxidation von NADH in der Atmungskette oder durch einen verminderten Transport von Reduktionsäquivalenten durch die Mitochondrienmembran verursacht. Für eine verminderte Reoxidation von NADH sprechen die folgenden Befunde, die auf eine Beeinträchtigung der Mitochondrienstruktur und -funktion nach mehrtägiger Glucocorticoidgabe hinweisen.

TICE und ENGEL (90) sahen in elektronenmikroskopischen Untersuchungen an der Skelettmuskulatur von Ratten, die eine vergleichbare Glucocorticoidbehandlung erfuhren, nach anfänglicher Proliferation einen umfangreichen Rückgang der Mitochondrienpopulation im M.gastrocnemius bzw. im M.soleus. Daneben wird über strukturelle Veränderungen der Mitochondrien wie Aggregation und Vacuolisierung berichtet (20, 22).

Die Auswirkungen einer langfristigen Triamcinolonbehandlung auf die Mitochondrienfunktion wurden von VIGNOS und GREENE untersucht (92). Dabei zeigte sich unter Zusatz verschiedener Substrate zum Inkubationsmedium eine Abnahme des Sauerstoffverbrauches durch die aus unterschiedlichen Muskeln isolierten Mitochondriensuspensionen. Der Effekt

trat insbesondere bei Muskeln mit einem hohen Anteil an „weißen", glykolytischen Muskelfasern auf. Da „weiße" Muskelfasern etwa die Hälfte der im M.gastrocnemius vorkommenden Fasern ausmachen (1), ist dieser Befund auch auf den M.gastrocnemius übertragbar. Die an Mitochondriensuspensionen erhobenen Befunde korrelieren gut mit der Reduktion des Sauerstoffverbrauches des gesamten Hinterkörperpräparates bei der Perfusion betamethasonvorbehandelter, adrenalektomiert-diabetischer Ratten (Abb. 22).

Die Erhöhung der Lactatfreisetzung nach dreitägiger Betamethasonsubstitution steht im Gegensatz zur verminderten Lactatfreisetzung nach einmaliger Hormongabe dreieinhalb Stunden vor der Perfusion (16, 46, 83). Unter Berücksichtigung der stark verminderten Glucoseaufnahme ist die Lactatfreisetzung nach der mehrtägigen Glucocorticoidgabe nicht nur absolut, sondern vor allem auch relativ zur aufgenommenen Glucose vermehrt, was einem erhöhten Grad der Rückgewinnung von Glucosekohlenstoff in Form von Lactat entspricht. Anders als bei der kurzfristigen Glucocorticoidapplikation scheint daher bei der längerfristigen Substitutionsbehandlung eine vermehrte Glucoserückgewinnung in Form des Gluconeogeneseprecursors Lactat zusätzlich zur Glucoseeinsparung infolge der Glucoseaufnahmehemmung sowie der später zu besprechenden gesteigerten Freisetzung glucogener Aminosäuren für die Glucosehomöostase von Bedeutung zu sein.

E) Alaninstoffwechsel unter Glucocorticoiden und Insulin

a) Bedeutung und Entstehung von Alanin

Die Aminosäure Alanin wird im frühen Hungerzustand vermehrt aus der Muskulatur freigesetzt und ist in dieser Situation neben Lactat das quantitativ bedeutendste Substrat der Lebergluconeogenese (24, 25) und somit ein wesentlicher Faktor für die Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase.

Der Anteil des Alanins an der Gesamtmenge der freigesetzten Aminosäuren übertrifft den Anteil am Aufbau des Muskelproteins um ein Mehrfaches. Die hohe Freisetzungsrate kann daher nicht allein mit dem aus der Proteolyse von Muskelproteinen anfallenden Alanin erklärt werden. Als Grundlage der Alaninfreisetzung muß vielmehr eine de novo-Synthese angenommen werden (24, 25).

Nach dem von FELIG (24) postulierten „Glucose-Alanin-Zyklus" entsteht Alanin in der Muskulatur aus der Aminierung von Pyruvat, welches aus exogener Glucose stammt. Das freigesetzte Alanin wird zur Glucoseneubildung in die Leber zurücktransportiert. Nach ODESSEY et al. (63) stammt die Aminogruppe des Alanins insbesondere aus dem Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren, die im Gegensatz zu den meisten anderen Aminosäuren bevorzugt in der Muskulatur metabolisiert werden. Der „Glucose-Alanin-Zyklus" beschreibt also - ähnlich wie der CORI-Zyklus - die Rückgewinnung eines Teiles der von der Muskulatur aufgenommenen Glucose.

Die Möglichkeit der Alaninbildung aus exogener Glucose wurde inzwischen in vielen in vitro-Experimenten unter Verwendung radioaktiv markierter Glucose bestätigt. Quantitative Angaben zum Umfang der Alaninbildung aus exogener Glucose unterscheiden sich beträchtlich und reichen bis zu 97 Prozent des freigesetzten Alanins (9, 10, 35, 63).

Daneben besteht die Möglichkeit der Alaninsynthese aus den Kohlenstoffskeletten anderer Aminosäuren (83). Nach CHANG und GOLDBERG (10, 11) sind nur Valin, Isoleucin, Aspartat, Asparagin und Glutamat dazu geeignet, die als einzige

Aminosäuren vom Muskel in Citratcycluszwischenprodukte abgebaut werden können. Citratcyclusintermediate können durch die in geringer Konzentration im Muskel nachgewiesene PEP-Carboxykinase in Verbindung mit der Pyruvatkinase sowie durch das Malatenzym (61) zu Pyruvat und schließlich zu Alanin umgewandelt werden.

Im folgenden soll nun der Frage nachgegangen werden, in welcher Weise die Freisetzung von Alanin durch Glucocorticoide und Insulin als möglichen physiologischen Regulatoren beeinflußt wird, um damit auch Rückschlüsse auf den hormonellen Regelmechanismus, welcher der gesteigerten Alaninfreisetzung während der frühen Hungeradaptation zugrunde liegt, ziehen zu können.

b) Glucocorticoidwirkungen auf die Alaninfreisetzung

Glucocorticoide haben eine primäre katabole Wirkung auf den Proteinstoffwechsel der extrahepatischen Gewebe, wie SMITH und LONG (86) aus der Erhöhung der Gesamtaminosäurenkonzentration nach Cortisolgabe bei eviscerierten, adrenalektomiert-diabetischen Ratten folgerten. MAYER und ROSEN (53, 54) konnten durch den Nachweis von Glucocorticoid-Receptoren im Muskelgewebe die Annahme der primären Wirkung des Hormons auf die Muskulatur bestätigen.

Die direkte Messung der Freisetzung von Alanin durch die Muskulatur während der Perfusion des isolierten Rattenhinterkörpers zeigt dreieinhalb Stunden nach einmaliger Applikation des Glucocorticoids Betamethason sowohl bei adrenalektomierten (46, 83, 87, 89) als auch bei adrenalektomiert-diabetischen (16) Ratten einen deutlichen Anstieg. Ebenso ist nach dreitägiger Betamethasonvorbehandlung adrenalektomiert-diabetischer Tiere die Alaninfreisetzung erhöht (Abb. 17). Die Steigerung gegenüber der jeweiligen Kontrollreihe ist dabei nach der mehrtägigen Behandlung der adrenalektomiert-diabetischen Tiere deutlicher ausgeprägt (+ 145 %) als nach der einmaligen Betamethasoninjektion (+ 73 %).

Die Höhe der Freisetzungsrate von Aminosäuren wird bestimmt von der Aktivität des Aminosäurentransportsystems sowie vom Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und Proteolyse. KOSTYO et al. (45) wiesen eine Hemmung der Aufnahme der nicht metabolisierbaren Aminosäure α-Aminoisobuttersäure (AIB) in das Rattenzwerchfell nach und führten diesen Glucocorticoideffekt auf eine Hemmung der Synthese eines essentiellen Transportproteins zurück. Eine Hemmung der Proteinsynthese durch Glucocorticoide ist durch den Nachweis des verminderten Einbaus radioaktiv markierter Aminosäuren in Muskelproteine vielfach belegt worden (88, 97). Über eine zusätzliche Stimulierung des Proteinabbaus liegen gegensätzliche Befunde vor (30, 85, 91).

Die Steigerung der Alaninfreisetzung bei verminderter Glucoseaufnahme unter Glucocorticoideinfluß scheint nicht mit dem Konzept des „Glucose-Alanin-Zyklus", zumindest nicht im Sinne einer linearen Beziehung vereinbar zu sein. Die vermehrte Alaninfreisetzung könnte allenfalls durch die Annahme erklärt werden, daß der prozentuale Anteil der aufgenommenen Glucose, der in Alanin umgewandelt wird, unter Glucocorticoiden deutlich erhöht ist. Der Anteil der in Alanin eingebauten Glucose bleibt jedoch nach vorangegangenen Untersuchungen am Hinterkörperpräparat mit radioaktiv markierter Glucose, in denen eine einmalige Betamethasonapplikation erfolgte, nahezu gleich (83). Das unter Glucocorticoiden zusätzlich freigesetzte Alanin kann demnach nicht aus exogener Glucose stammen. Vielmehr soll es einerseits aus proteolytisch freiwerdendem Alanin bestehen, welches aufgrund der Hemmung der Proteinsynthese in vermindertem Umfang reutilisiert wird. Darüber hinaus fallen nach Glucocorticoidgabe auch vermehrt solche Aminosäuren an, die über Citratcyclusintermediate in Pyruvat und damit in Alanin umgewandelt werden können. Die gesteigerte Alaninfreisetzung unter Glucocorticoiden beruht also auf der Bereitstellung neuen gluconeogenetischen Materials und nicht auf der gesteigerten Reutilisation von Glucose im „Glucose-Alanin-Zyklus".

c) Insulinwirkungen auf die Alaninfreisetzung

Über den Effekt von Insulin auf die muskuläre Freisetzung von Alanin existieren unterschiedliche Befunde. POZEFSKY und FELIG (69) sahen am menschlichen Unterarm nach Insulingabe eine signifikant verminderte arterio-venöse Differenz lediglich bei den verzweigtkettigen und einigen anderen Aminosäuren, nicht jedoch bei Alanin. FELIG (24, 25) nahm daher an, daß die Verringerung der Gluconeogenese aus Alanin unter Insulin nicht durch eine Minderung der peripheren Alaninmobilisation, sondern durch eine Verringerung der hepatischen Extraktion zustandekommt.

Ein signifikanter Insulineffekt auf die periphere Alaninproduktion konnte auch bei in vitro-Untersuchungen weder von GARBER et al. (28) am inkubierten M.epitrochlearis der Ratte noch von RUDERMAN et al. (79) am perfundierten Hinterkörper normaler Ratten nachgewiesen werden. Andere in vitro-Versuchsergebnisse sprechen dagegen für eine Verminderung der Alaninfreisetzung aus der Muskulatur bei normalen (35, 74) bzw. adrenalektomierten (89) Tieren.

In dreistündigen Perfusionsversuchen am Herzmuskel fanden JEFFERSON et al. (42) einen freisetzungssenkenden Effekt des Insulins erst in der Phase des Insulinmangels, der sich nach der ersten Stunde einstellte. Diesem Ergebnis entspricht der Befund von RUDERMAN et al. (79) am perfundierten Rattenhinterkörper, die eine Senkung der Alaninfreisetzung durch Insulin nur bei diabetischen, nicht jedoch bei normalen Tieren feststellten.

Ebenso wie bei den vorangegangenen Kurzzeitexperimenten mit adrenalektomiert-diabetischen Ratten (16), reduziert auch mehrtägige Insulinsubstitution die Alaninfreisetzung während der Perfusion (Abb. 17). Dabei ist der Effekt der Insulinsubstitution (- 41 %) ausgeprägter als derjenige bei Insulinzusatz zum Perfusionsmedium (- 22 %). Diese Befunde werden ergänzt durch die Beobachtung in eigenen, hier nicht dargestellten Versuchen, daß die Alaninfreisetzung bei diabetischen Tieren gegenüber Normaltieren hochsignifikant erhöht ist.

Im Gegensatz zu Glucocorticoiden stimuliert Insulin den Aminosäurentransport in die Muskelzelle, fördert die Proteinsynthese und hemmt die Proteolyse (27, 42, 98).

d) Alaninfreisetzung unter kombinierter Insulin- und Glucocorticoidsubstitution

Den Nachweis für das Zusammenwirken von Glucocorticoiden und Insulin bei der Regulation der Alaninfreisetzung aus der Skelettmuskulatur erbringt die Alaninfreisetzungsrate bei kombinierter Hormonsubstitution: Es ergibt sich eine mittlere Freisetzungsrate (Abb. 17), die als Resultante der antagonistischen Wirkung der beiden Hormone aufgefaßt werden kann. Die Rate der Alaninfreisetzung aus der Muskulatur ist demnach vom Insulin-Glucocorticoid-Verhältnis abhängig.

Die eingangs aufgeworfene Frage, welcher hormonelle Regelmechanismus für die Steigerung der Alaninfreisetzung im Rahmen der frühen Hungeradaption verantwortlich ist, läßt sich nun mit Hilfe der in vitro erhobenen Befunde zwanglos beantworten: Mit sinkenden Blutglucosespiegeln fällt auch die Insulinkonzentration im Plasma ab, wodurch es zum Überwiegen der Glucocorticoidwirkung auf den Muskel und damit zur vermehrten Bereitstellung von Alanin kommt.

e) Hormoneffekte auf die intramuskuläre Alaninkonzentration

Weiteren Aufschluß über die Wirkungsweise der beiden Hormone geben die intramuskulären Alaninkonzentrationen. Nach der dreitägigen Betamethasonbehandlung adrenalektomiert-diabetischer Ratten ist die am Ende der Perfusion gemessene Alaninkonzentration im M.gastrocnemius deutlich erniedrigt (Abb. 18). Dieser Befund findet Bestätigung durch in vivo-Untersuchungen an ebenfalls längerfristig steroidbehandelten adrenalektomierten Ratten (54, 83). Dagegen wird der Alaningehalt dreieinhalb Stunden nach einer einmaligen Betamethasongabe sowohl in vivo (83) als auch post perfusionem (16) leicht erhöht gefunden.

Die Muskel/Plasma-Relation für Alanin am Ende der Perfusion ist bei den längerfristig mit Betamethason behandelten

adrenalektomiert-diabetischen Tieren deutlich reduziert (Tab. 6) und entspricht dem in vivo gemessenen Wert nach Langzeitbehandlung von adrenalektomierten Tieren (83).

Die Steigerung der Alaninfreisetzung trotz Reduktion des aus der Zelle gerichteten Konzentrationsgradienten unter Betamethasonbehandlung weist darauf hin, daß die Freisetzung von Alanin nicht alleine durch Diffusion erklärbar ist, sondern der Kontrolle eines hormonell beeinflußbaren Transportsystems unterliegt. Die Erhöhung der Freisetzungsrate, d.h. des Nettoefflux es läßt darauf schließen, daß durch Betamethason eine Hemmung des Einwärtstransportes und/oder eine Stimulation des Auswärtstransportes bewirkt wurde. Dabei deutet die weitgehende Entleerung des Alaninpools nach längerfristiger Betamethasonapplikation an, daß der Nettoefflux von Alanin über die Zellmembran offenbar mehr stimuliert wurde als die Bereitstellung von Alanin für den Muskelpool aufgrund der Proteinsynthesehemmung.

Auch nach der mehrtägigen Insulinsubstitution adrenalektomiert-diabetischer Ratten ist der freie Muskelpool an Alanin verringert (Abb. 18). Ein entsprechender Befund wurde von JEFFERSON et al. (41) erhoben, die bei prolongierter Hinterkörperperfusion normaler Ratten unter Insulinzusatz zum Medium einen erniedrigten Alaninpool für das Ende der dritten Perfusionsstunde nachweisen konnten. Die Erklärung für die Erniedrigung des Muskelgehaltes an freiem Alanin dürfte in der Stimulation der Proteinsynthese durch Insulin mit dem verstärkten Einbau von Alanin in Muskelproteine liegen (41, 98). Der Befund verdeutlicht, daß die Stimulation der Proteinsynthese durch Insulin nicht die Folge eines erhöhten intramuskulären Aminosäureangebotes darstellt, sondern einen Angriffspunkt im Proteinsynthesemechanismus selbst haben muß (41, 42).

Kombinierte Substitution von Betamethason und Insulin bewirkt eine signifikante Auffüllung des Alaninpools im Vergleich zum Wert nach alleiniger Gabe des jeweiligen Hormons (Abb. 18). Dieses Phänomen kann - ähnlich wie die

Zunahme der intramuskulären Glucose- und Pyruvatkonzentration nach Doppelsubstitution - auf eine unterschiedliche Ausprägung des Insulinantagonismus der Glucocorticoide bei zwei aufeinanderfolgenden subzellulären Stoffwechselvorgängen zurückgeführt werden: Die insulinantagonistische Glucocorticoidwirkung auf die Proteinsynthese im Sinne einer Synthesehemmung übertrifft die insulinantagonistische Glucocorticoidwirkung auf den Aminosäuretransport, so daß die Bereitstellung von Alanin den Nettoefflux überwiegt und eine intramuskuläre Akkumulation von Alanin eintritt.

F) Glutaminfreisetzung unter Glucocorticoiden und Insulin

Neben Alanin wird auch Glutamin in großem Umfang von der Muskulatur freigesetzt (25, 79). Bei den mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten adrenalektomiert-diabetischen Kontrolltieren ist die Glutaminproduktion (Abb. 19) sogar etwas höher als die Alaninproduktion (Abb. 17).

Glutamin wird in weit stärkerem Maße vom Muskel abgegeben, als es seinem Anteil am Muskelprotein entspricht, so daß ebenso wie beim Alanin eine de novo-Synthese angenommen wird. Die Glutaminsynthese soll dabei aus dem Kohlenstoffskelett anderer Aminosäuren erfolgen (11, 28, 79). Nach CHANG und GOLDBERG (11) können jedoch lediglich die Aminosäuren Asparagin, Aspartat, Glutamat, Valin und Isoleucin in Glutamin überführt werden. Das bei der Glutaminsynthese zusätzlich benötigte Ammoniak schließlich soll aus der Desaminierung von Aminosäuren stammen oder aus dem Blut aufgenommen werden.

Nach dreitägiger Betamethasonbehandlung ist die Glutaminfreisetzung (Abb. 19) aus der Muskulatur adrenalektomiert-diabetischer Ratten deutlicher gesteigert (+ 140 %) als nach einmaliger Applikation des Glucocorticoids (+ 39 %). Die auch von anderen Autoren (9, 83) bestätigte Erhöhung der muskulären Glutaminfreisetzung unter Glucocorticoiden ist durch die Hemmung der Proteinsynthese zu erklären, wodurch für die Glutaminsynthese benötigte Aminosäuren in vermehrtem Umfang zur Verfügung gestellt werden (83).

Nach mehrtägiger Insulinsubstitution (Abb. 19) läßt sich kein eindeutiger Effekt auf die Freisetzung des Glutamins feststellen. Im Gegensatz dazu wird zwar nach kurzfristigem Insulinzusatz zum Medium von einem Teil der Untersucher über eine Reduktion der muskulären Glutaminfreisetzung berichtet (79, 89), andere Autoren (16, 28) sahen aber ebenfalls keinen Effekt des Insulins.

Demgegenüber wird die Steigerung der Glutaminfreisetzung unter alleiniger Betamethasongabe durch die zusätzliche Insulinsubstitution bei kombinierter Hormongabe deutlich abgeschwächt (Abb. 19). Durch Insulin kann also zumindest die hochgradig gesteigerte Glutaminproduktion unter Betamethason reduziert werden. Dadurch wird demonstriert, daß auch die muskuläre Glutaminfreisetzung dem antagonistischen Einfluß der beiden Hormone unterliegt.

Anders als Alanin wird von der Muskulatur freigesetztes Glutamin nicht zur Lebergluconeogenese verwandt. So erfolgt die Extraktion von Glutamin auch vornehmlich im Darm und in der Niere (25).

Im Darm soll Glutamin hauptsächlich als Energieträger dienen (26, 96). In der Niere kann das Kohlenstoffskelett des Glutamins als Gluconeogeneseprecursor verwandt werden, während der durch die Glutaminase-Reaktion in der Tubuluszelle entstehende Ammoniak zur Neutralisation von Säuren herangezogen wird (23).

An der Regulation der Glutaminfreisetzung sind neben hormonellen auch andere Faktoren beteiligt. So stellt eine Acidose den adäquaten Stimulus für eine ausgeprägte Erhöhung der Glutaminfreisetzung aus der Muskulatur dar, die gleichzeitig mit einer entsprechenden Steigerung der renalen Extraktion einhergeht (32).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Am Modell des isoliert perfundierten Hinterkörpers der Ratte wurde der Effekt der längerfristigen Glucocorticoidapplikation auf die Glucoseutilisation und die Aminosäurefreisetzung der Skelettmuskulatur sowie die hormonelle Interaktion von Glucocorticoiden mit Insulin untersucht.

Die Glucoseaufnahme der Skelettmuskulatur wird durch dreitägige Betamethasongabe hochsignifikant um die Hälfte reduziert. Eine indirekte Glucocorticoidwirkung auf die Glucosephosphorylierung im Sinne eines „Glucose-Fettsäuren-Zyklus" kann dabei ausgeschlossen werden ; ein direkter Glucocorticoideffekt auf den Glucosemembrantransport muß angenommen werden.

Der unter in vitro-Zusatz von Insulin zum Perfusionsmedium gesteigerte muskuläre Glucosetransport wird nach vorangegangener Betamethasonbehandlung auf weniger als die Hälfte limitiert. Dieser Befund korreliert mit der klinischen Beobachtung einer verminderten Insulinwirkung auf die Blutglucosekonzentration nach längerfristig erhöhter Glucocorticoidpräsenz. Die möglicherweise zugrunde liegenden Mechanismen werden diskutiert.

Die Verminderung der muskulären Glucoseaufnahme bei kombinierter Hormonbehandlung gegenüber alleiniger Insulinbehandlung in vivo ist wahrscheinlich Folge einer Einschränkung der Hexokinase-katalysierten Glucosephosphorylierung. Unter den verschiedenen Versuchsbedingungen läßt sich somit eine direkte, inhibierende Glucocorticoidwirkung sowohl auf den Membrantransport als auch auf die Phosphorylierung der Glucose demonstrieren.

Als weitere Glucocorticoideffekte sind eine Steigerung der Lactatproduktion sowie eine Hemmung der Pyruvatutilisation zu nennen.

Die Alaninfreisetzung der Skelettmuskulatur, ein wichtiger Faktor der Glucosehomöostase im Hungerzustand, unterliegt der Kontrolle durch Glucocorticoide und Insulin. Während die mehrtägige Gabe der einzelnen Hormone eine hochsignifikante Steigerung bzw. Verminderung der Alaninproduktion bewirkt, führt die kombinierte Hormonbehandlung zu einer mittleren Freisetzungsrate als Resultante der gegensätzlichen Wirkung der beiden Hormone.

Glucocorticoide bewirken an der Skelettmuskulatur im wesentlichen drei verschiedene Stoffwechseleffekte, die zu einer Steigerung der Glucoseverfügbarkeit im Gesamtorganismus führen:

- Die Glucoseeinsparung infolge einer Hemmung der Glucoseaufnahme sowie der intracellulären Glucoseutilisation.
- Die erhöhte Glucoserückgewinnung in Form des Gluconeogenesevorläufers Lactat.
- Die vermehrte Bereitstellung glucoplastischer Aminosäuren, insbesondere von Alanin.

VII. DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Wolfgang Staib bin ich dafür verbunden, daß er mir das Dissertationsthema überlassen, einen Arbeitsplatz im Institut bereitgestellt und die Untersuchungen mit seinem Interesse begleitet hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. habil. Martin Schwenen. Er hat mich in das Arbeitsgebiet eingeführt und mich bei der Durchführung der Tieroperationen unterstützt. Seine Ratschläge waren mir bei den Versuchen und bei der Niederschrift der Arbeit eine wertvolle Hilfe.

Frau Grete Hannemann danke ich dafür, daß sie mir bei den Untersuchungen gewissenhaft und mit großer Einsatzbereitschaft geholfen hat.

Meine Mutter hat die Mühe auf sich genommen, das Manuskript zu schreiben. Dafür gebührt ihr ebenfalls ein besonderer Dank.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. ARIANO,M.A., ARMSTRONG,R.B., EDGERTON, V.R.
Hindlimb muscle fiber populations of five mammals
J Histochem Cytochem 21 (1973), 51-55

2. ARIYOSHI,Y., PLAGER,J., MATSUI,N.
The influence of cortisol on 2-deoxyglucose penetration and phosphorylation by the mouse ear strip preparation
Acta Endocrinologica 74 (1973), 723-731

3. BERGAMINI,E., GAGLIARDI,C., PELLEGRINO,C.
Dependence on insulin of the hydrocortisone effect on muscle glycogen content
FEBS Letters 4 (1969), 1-3

4. BERGAMINI,E.
Additive effects of testosterone and insulin on glycogen content and 2-deoxyglucose phosphorylation in rat levator ani muscle
Biochim Biophys Acta 177 (1969), 235-240

5. BERGER,M., RUDERMAN,N.B., HAGG,S.A., GOODMAN,M.N.
Glucose metabolism in perfused skeletal muscle
Effects of starvation, diabetes, fatty acids, acetoacetate, insulin and exercise on glucose uptake and deposition
Biochem J 158 (1976), 191-202

6. BERNSTEIN,R.S., KIPNIS,D.M.
Regulation of rat hexokinase isoenzymes
II. Effects of growth hormone and dexamethasone
Diabetes 22 (1973), 923-931

7. BERNT,E., BERGMEYER,H.U.
L-Glutamat, UV-Test mit Glutamat-Dehydrogenase und NAD
in: Methoden der enzymatischen Analyse (BERGMEYER,H.U., Hrsg.), Verlag Chemie,Weinheim; (^{3}1974),Bd.II,1749-1753

8. BUSCHIAZZO,H., EXTON,J.H., PARK,C.R.
Effects of glucose on glycogen synthetase, phosphorylase, and glycogen deposition in the perfused rat liver
Proc Nat Acad Sci 65 (1970), 383-387

9. CALDWELL,M.D., LACY,W.W., EXTON,J.H.
Effects of adrenalectomy on the amino acid and glucose metabolism of the perfused rat hindlimb
J Biol Chem 253 (1978), 6837-6844

10. CHANG,T.W., GOLDBERG,A.L.
The origin of alanin produced in skeletal muscle
J Biol Chem 253 (1978), 3677-3684

11. CHANG,T.W., GOLDBERG,A.L.
The metabolic fates of amino acids and the formation of glutamine in skeletal muscle
J Biol Chem 253 (1978), 3685-3695

12. CHAUDRY,I.H., ADZICK,N.S., SAYEED,M.M., BAUE,A.E.
Effect of hydrocortisone and dexamethasone on xylose uptake by isolated soleus muscle
Biochim Biophys Acta 399 (1975), 85-89

13. CHIASSON,J.L., DIETZ,M.R., SHIKAMA,H., WOOTTEN,M., EXTON,J.H.
Insulin regulation of skeletal glycogen metabolism
Am J Physiol 239 (1980), E69-E74

14. CIGOLINI,M., SMITH,U.
Human adipose tissue in culture.
VIII.Studies on the insulin-antagonistic effect of glucocorticoids
Metabolism 28 (1979), 502-510

15. COHEN,P.
The hormonal control of glycogen metabolism in mammalian muscle by multivalent phosphorylation
Biochem Soc Trans 7 (1979), 459-480

16. COONE,H.J.
Akute Glucocorticoid- und Insulinwirkungen am isoliert perfundierten Hinterkörper adrenalektomiert-diabetischer Ratten
Diss med, Universität Düsseldorf

17. CZECH,M.P., FAIN,J.N.
Antagonism of insulin action on glucose metabolism in white fat cells by dexamethasone
Endocrinology 91 (1972), 518-522

18. CZOK,R., LAMPRECHT,W.
Pyruvat, Phosphoenolpyruvat und D-Glycerat-2-phosphat
in: Methoden der enzymatischen Analyse (BERGMEYER,H.U.,
Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim; (^{3}1974), Bd.II,
1491-1496

19. DAGLEY,S.
Citrat, UV-spektophotometrische Bestimmung
in: Methoden der enzymatischen Analyse (BERGMEYER,H.U.,
Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim; (^{3}1974), Bd.II,
1607-1611

20. D'AGOSTINO,A.N., CHIGA,M.
Cortisone myopathy in rabbits, a light and
electron microscopic study
Neurology 16 (1966), 257-263

21. DE BARSY,T., STAHLMANS,W., LALOUX,M., DE WULF,H., HERS,H.G.
The effect of glucose on the conversion of
muscle phosphorylase a into b
Biochem Biophys Res Commun 46 (1972), 183-190

22. ENGEL,A.G.
Electron microscopic observations in thyrotoxic and
corticosteroid-induced myopathies
Mayo Clin Proc 41 (1966), 785-796

23. EXTON,J.H.
Gluconeogenesis
Metabolism 21 (1972), 945-990

24. FELIG,P.
The glucose-alanine-cycle
Metabolism 22 (1973), 179-207

25. FELIG,P.
Amino acid metabolism in man
Annu Rev Biochem 44 (1975), 933-955

26. FELIG,P., KOIVISTO,V.
Recent advances in body fuel metabolism
Contemporary Metabolism, Vol. 1 Ed. by N.FREINKEL
Plenum Medical Book Company, New York, London
(1979), 359-384

27. FULKS,R.M., LI,J.B., GOLDBERG,A.L.
Effects of insulin, glucose and amino acids on protein turnover in rat diaphragma
J Biol Chem 250 (1975), 290-298

28. GARBER,A.J., KARL,I.E., KIPNIS,D.M.
Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle
I. Glycolysis and amino acid release
II. The precursor role of amino acids in alanine and glutamine sythesis
III. Dietary and hormonal regulation
J Biol Chem 251 (1976), 826-850

29. GAVIN,J.R., ROTH,J., NEVILLE,D.M., DE MEYTS,P., BUELL,D.N.
Insulin-dependent regulation of insulin receptor concontrations: A direct demonstration in cell culture
Proc Nat Acad Sci 71 (1974), 84-88

30. GOLDBERG,A.L., TISCHLER,M., DE MARTINO,G., GRIFFIN,G.
Hormonal regulation of protein degradation and synthesis in skeletal muscle
Fed Proc 39 (1980), 31-36

31. GOLDMAN,J.K., FROHMAN,L.A.
Effects of glucocorticoid administration to rats on in vitro intermediary metabolism
J Pharmacol Exp Ther 188 (1974), 310-317

32. GOLDSTEIN,L., SCHRÖCK,H., CHUNG-JA CHA
Relationship of muscle glutamine production to renal ammonia metabolism
Biochem Soc Trans 8 (1980), 509-510

33. GOODMAN,M.N., RUDERMAN,N.B., BERGER,M.
Glucose metabolism in rat skeletal muscle at rest: Effect of starvation, diabetes, ketone bodies and fatty acids
Diabetes 23 (1974), 881-888

34. GRAY,J.G., PRATT,W.B., ARONOW,L.
Effect of glucocorticoids on hexose uptake by mouse fibroblasts in vitro
Biochemistry 10 (1971), 277-284

35. GRUBB,B.
De novo synthesis of alanine by the perfused rat hindlimb
Am J Physiol 230 (1976), 1379-1384

36. GUTMAN,I., WAHLFELD,A.W.
L-(+)-Lactat, Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase und NAD
in: Methoden der enzymatischen Analyse (BERGMEYER,H.U., Hrsg.), Verlag Chemie,Weinheim (^{3}1974), Bd.II, 1510-1514

37. HENDERSON,M.J., MORGAN,H.E., PARK,C.R.
Regulation of glucose uptake in muscle
V. The effect of growth hormone on glucose transport in the isolated perfused rat heart
J Biol Chem 236 (1961), 2157-2161

38. HENNES,A.R., WAJCHENBERG,B.L., FAJANS,S.S., CONN,J.W.
The effect of adrenal steroids on blood levels of pyruvic and alpha-ketoglutaric acids in normal subjects
Metabol Clin Exptl 6 (1957), 339-345

39. HERS,H.G., HUE,L., VAN DE WERVE,G., STALMANS,W., FELIU,J.E.
The homeostatic and hormonal control of the level of glycemia by the liver
Hormones and Cell Regulation, First European Symposium of (1977), 111-118
Editors: Dumont and Nunez

40. HOLMES,P.A., MANSOUR,T.E.
Glucose as a regulator of glycogen phosphorylase in rat diaphragma
I. Effect of glucose and related compounds on phosphorylase and glycogen levels
Biochim Biophys Acta 156 (1968), 266-274

41. JEFFERSON,L.S., RANNELS,D.E., MUNGER,B.L., MORGAN,H.E.
Insulin in the regulation of protein turnover in heart and skeletal muscle
Fed Proc 33 (1974), 1098-1104

42. JEFFERSON,L.S., LI,J.B., RANNELS,S.R.
Regulation by insulin of amino acid release and protein turnover in the perfused rat hemicorpus
J Biol Chem 252 (1977), 1476-1483

43. KATZEN,H.M.
The multiple forms of mammalian hexokinase and their significance to the action of insulin
Adv. Enz. Regul. 5 (1967), 335-356

44. KERPPOLA,W.
Accumulation of pyruvic acid in the blood during treatment with cortisone or ACTH, and in cushing's syndrome
Acta Med Scand 145 (1953), 357-360

45. KOSTYO,J.L., REDMOND,A.F.
Role of protein synthesis in the inhibitory action of adrenal steroid hormones on amino acid transport by muscle
Endocrinology 79 (1966), 531-540

46. KÜHN-VELTEN,N.
Regulationsmechanismen am insulinfrei perfundierten Hinterkörper der Ratte:
Stoffwechseländerungen durch unterschiedlich hohe Glucoseangebote sowie durch Adrenalektomie und einmalige Betamethasonapplikation in vivo
Diss med (1977), Universität Düsseldorf

47. LANG,G., MICHAL,G.
D-Glucose-6-Phosphat und D-Fructose-6-Phosphat
in: Methoden der enzymatischen Analyse (BERGMEYER,H.U., Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim; (^{3}1974), Bd.II, 1283-1287

48. LEWIS,S.B., SCHULTZ,T.A., DANIELS,E.L., BLIZIOTES,M.M. MONTAGUE,W.
Prolonged effect of insulin on glucose uptake by rat skeletal muscle
Biochem J 186 (1980), 733-738

49. LÖFFLER,G., WEISS,L.
Stoffwechselwirkungen des Insulins
II. Die Stoffwechselwirkungen des Insulins
Handb. d. Inneren Medizin, Bd.7, Teil 2A, 275-303

50. LUND,P.
L-Glutamin, Bestimmung mit Glutaminase und Glutamat-Dehydrogenase
in: Methoden der enzymatischen Analyse (BERGMEYER,H.U., Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim; (^{3}1974), Bd.II, 1767-1769

51. MARCO,J., MELANI,F., GOBERNA,R., ROTT,W.H., PFEIFFER,E.F.
The effect of prednisolone on insulin secretion in the rat
Diabetologica 5 (1969), 48

52. MATSUI,N., PLAGER,J.E.
„Anti-insulin" action of cortisol.
1. Influence of cortisol on the metabolism of specifically labeled glucose, pyruvat and glucose-6-phosphat
Endocrinology 84 (1969), 1439-1449

53. MAYER,M., ROSEN,F.
Glucocorticoid receptors in skeletal muscle
Isr J Med Sci 11 (1975), 699-707

54. MAYER,M., SHAFRIR,E., KAISER,N., MILHOLLAND,R.J., ROSEN,F.
Interaction of glucocorticoid hormones with rat skeletal muscle: Catabolic effects and hormone binding
Metabolism 25 (1976), 157-167

55. MORGAN,H.E., HENDERSON,M.J., REGEN,D.M., PARK,C.R.
Regulation of glucose uptake in muscle
I. The effects of insulin and anoxia on glucose transport and phosphorylation in the isolated perfused heart of normal rats
J Biol Chem 236 (1961), 253-261

56. MORGAN,H.E., REGEN,D.M., HENDERSON,M.J., SAWYER,T.K., PARK,C.R.
Regulation of glucose uptake in muscle
VI. Effects of hypophysectomie, growth hormone, hydrocortisone, and insulin on glucose transport and phosphorylation in the perfused rat heart
J Biol Chem 236 (1961), 2162-2168

57. MORGAN,H.E., NEELY,J.R.
Insulin and membrane transport
in: Handbook of Physiology (GEIGER,S.R., ed.)
Section7, Volume 1: Endocrine Pancreas, Washington,D.C. (1972), 323-331

58. MORITA,Y., MUNCK,A.
Effect of glucocorticoids in vivo and in vitro on net glucose uptake and amino acid incorporation by rat-thymus cells
Biochim Biophys Acta 93 (1964), 150-157

59. MUNCK,A.
Studies on the mode of action of glucocorticoids in rats: II. The effects in vivo and in vitro on net glucose uptake by isolated adipose tissue
Biochim Biophys Acta 57 (1962), 318-326

60. MUNCK,A.
Glucocorticoid inhibition of glucose uptake by peripheral tissues: Old and new evidence, molecular mechanisms, and physiological significance
Perspect Biol Med 14 (1971), 265-289

61. NOLTE,J., BRDICZKA,D., PETTE,D.
Intracellular distribution of phosphoenolpyruvate carboxylase and (NADP) malat dehydrogenase in different muscle types
Biochim Biophys Acta 284 (1972), 497-507

62. Effects of Dexamethasone on Glucose Metabolism
Nutrition Reviews 34 (1976), 185-187

63. ODESSEY,R., KHAIRALLAH,E.A., GOLDBERG,A.L.
Origin and possible significance of alanine production by skeletal muscle
J Biol Chem 249 (1974), 7623-7629

64. OLEFSKY,J.M., JOHNSON,J., LIU,F., JEN,P., REAVEN,G.M.
The effects of acute and chronic dexamethasone administration on insulin binding to isolated rat hepatocytes and adipocytes
Metabolism 24 (1975), 517-527

65. OLEFSKY,J.M.
Effect of dexamethasone on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation of isolated rat adipocytes
J Clin Invest 56 (1975), 1499-1508

66. OVERELL,B.G., CONDON,S.E., PETROW,V.
The effect of hormones and their analogues upon the uptake of glucose by mouse skin in vitro
J Pharm Pharmacol 12 (1960), 150-153

67. PALMER,B.G.
The effect of cortisol on body weight and muscle metabolism in the rat
J Endocrin 36 (1966), 73-83

68. PERLEY,M., KIPNIS,D.M.
Effect of glucocorticoids on plasma insulin
New Engl J Med 274 (1966), 1237-1241

69. POZEFSKY,T., FELIG,F., TOBIN,J.D., SOELDNER,J.S., CAHILL,G.F.,JR.
Amino acid balance across tissues of the forearm in postabsorptive man. Effects of Insulin at two dose levels
J Clin Invest 48 (1969), 2273-2282

70. RAMEY,E.R.
Corticosteroids and skeletal muscle
in: Handbook of Physiology (GEIGER,S.R.,editor)
Section 7, Volume 6: Adrenal Gland, Washington D.C.
(1975), 245-261

71. RANDLE,P.J., MORGAN,H.E.
Regulation of glucose uptake by muscle
Vit Horm 20 (1962), 199-249

72. RANDLE,P.J., NEWSHOLME,E.A., GARLAND,P.B.
Regulation of glucose uptake by muscle
8. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate,
and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake
and metabolic fate of glucose in rat heart
and diaphragma muscles
Biochem J 93 (1964), 652-665

73. RANDLE,P.J., GARLAND,P.B., HALES,C.N., NEWSHOLME,E.A.,
DENTON,R.M., POGSON,C.I.
Interactions of metabolism and the physiological
role of insulin
Recent Prog Horm Res 22 (1966), 1-44

74. REIMER,F., LÖFFLER,G., HENNIG,G., WIELAND,O.H.
The influence of insulin on glucose and fatty
acid metabolism in the isolated perfused rat
hind quarter
Hoppe Sylers Z Physiol Chem 356 (1975), 1055-1066

75. RENNIE,M.J., HOLLOSZY,J.O.
Inhibition of glucose uptake and glycogenolysis
by availability of oleate in well-oxygenated
perfused skeletal muscle
Biochem J 168 (1977), 161-170

76. RIDDICK,Jr.,F.A., REISLER,D.M., KIPNIS,D.M.
The sugar transport system in striated muscle
- Effect of growth hormone, hydrocortisone
and alloxan diabetes
Diabetes 11 (1962), 171-178

77. RUDAS,B.
Streptozotocin
Arzneim Forsch 22 (1972), 830-861

78. RUDERMAN,N.B., HOUGHTON,C.R.S., HEMS,R.
Evaluation of the isolated perfused rat hind-quarter for the study of muscle metabolism
Biochem J 124 (1971), 639-651

79. RUDERMAN,N.B., BERGER,M.
The formation of glutamine and alanine in skeletal muscle
J Biol Chem 249 (1974), 5500-5506

80. RUDERMAN,N.B., SCHMAHL,F.W., GOODMAN,M.N.
Regulation of alanine formation and release in rat muscle in vivo: Effect of starvation and diabetes
Am J Physiol 233 (1977), E109-E114

81. RUDERMAN,N.B., KEMMER,F.W., GOODMAN,M.N., BERGER,M.
Effect of perfusion with aged, fresh and aged-rejuvenated erythrocytes on oxygen consumption, tissue metabolites and inhibition of glucose utilisation by acetoacetate
Biochem J 190 (1980), 57-64

82. SCHADE,D.S., EATON,R.P., STANDEFER,J.
Glucocorticoid regulation of plasma ketone body concentration in insulin deficient man
J Clin Endocrinol Metab 44 (1977), 1069-1079

83. SCHADEWALDT,P.
Glucocorticoidwirkungen auf den Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel des Skelettmuskels
Math.-Nat. Diss, (1980), Universität Düsseldorf

84. SEIFTER,S., DAYTON,S., NOVIC,B., MUNTWYLER,E.
The estimation of glycogen with anthrone reagent
Arch Biochem 25 (1950), 191-200

85. SHOJI,S., PENNINGTON,R.J.T.
The effect of cortisone on protein breakdown and synthesis in rat skeletal muscle
Mol Cell Endocrinol 6 (1977), 159-169

86. SMITH,O.K., LONG,C.N.H.
Effect of cortisol on the plasma amino nitrogen of eviscerated adrenalectomized-diabetic rats
Endocrinology 80 (1967), 561-566

87. STASCHOCK,W.
Zeitliche Entwicklung, Insulin- und Actinomycin-D-Beeinflussung der akuten Glucocorticoidwirkungen am isoliert perfundierten Hinterkörper adrenalektomierter Ratten
Diss med (1978), Universität Düsseldorf

88. STEELE,R.
Influences of corticosteroids on protein and carbohydrate metabolism
in: Handbook of Physiology (GEIGER,S.R., ed.)
Section 7, Volume 6: Adrenal Gland, Washington D.C.
(1975), 135-167

89. THIENHAUS,R., THARANDT,L., ZAIS,U., STAIB,W.
Einfluß von Glucocorticoiden auf die Freisetzung von Aminosäuren des perfundierten Hinterkörpers adrenalektomierter Ratten
Hoppe Seylers Z Physiol Chem 356 (1975), 811-817

90. TICE,L.W., ENGEL,A.G.
The effects of glucocorticoids on red and white muscles in the rat
Am J Pathol 50 (1967), 311-333

91. TOMAS,F.M., MUNRO,H.N., YOUNG,V.R.
Effect of glucocorticoid administration on the rate of muscle protein breakdown in vivo in rats, as measured by urinary excretion of N^{τ}-methylhistidine
Biochem J 178 (1979), 139-146

92. VIGNOS,JR.,P.J., GREENE,R.
Oxidative respiration of skeletal muscle in experimental corticosteroid myopathy
J Lab Clin Med 81 (1973), 365-378

93. WAGNER.T.
Diss med, Universität Düsseldorf, in Vorbereitung

94. WERNER,W., REY,H.-G., WIELINGER,H.
Über die Eigenschaften eines neuen Chromogens für die Blutzuckerbestimmung nach der GOD/POD-Methode
Z Anal Chem 252 (1970), 224-228

95. WILLIAMSON,D.H.
L-Alanin, Bestimmung mit Alanin-Dehydrogenase
in: Methoden der enzymatischen Analyse (BERGMEYER, H.U., Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim; (^{3}1974), Bd.II, 1724-1727

96. WINDMUELLER,H.G., SPAETH,A.E.
Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels in vivo for post-absorptive rat small intestine
J Biol Chem 253 (1978), 69-76

97. WOOL,I.G., WEINSHELBAUM,E.I.
Incorporation of C^{14}-amino acids into protein of isolated diaphragmas: Role of the adrenal steroids
Am J Physiol 197 (1959), 1089-1092

98. WOOL,I.G.
Relation of effects of insulin on amino acid transport and on protein synthesis
Fed Proc 24 (1965), 1060-1070

99. ZIMMERMANN,H.
Die Wirkungen der Corticosteroide auf den Kohlenhydratstoffwechsel
Handb. d. Inneren Medizin, Bd.7, Teil 2A, 473-502

100. ZYSKOWSKI,L., MUNCK,A.
Interactions of cortisol and anoxia on hexose transport in rat thymocytes
Fed Proc 34 (1975), 329

101. Documenta GEIGY, Wissenschaftliche Tabellen, Basel, (^{6}1960), 32

LEBENSLAUF

Name	Christoph Cassier	
Geburtsdatum	27.09.1957 in	Homberg/Niederrhein
Eltern	Dr. rer. pol. Siegfried C. Cassier und Gerda Cassier, geb. Bruns	
Wohnort	4044 Kaarst 1, Karlsforster Str. 31	
Staatsangehörigkeit	deutsch	
Schulbildung	1964-1967	Volksschule, Neuss
	1967-1976	Theodor-Schwann-Gymnasium, Neuss
	Mai 1976	Reifeprüfung
Wehrdienst	Juli 1976 bis September 1976	Grundausbildung als Sanitäter in Budel/Niederlande
Studium	seit Wintersemester 1976/77	Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf
	August 1978	Ärztliche Vorprüfung
	August 1979	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	März 1982	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	April 1982 bis März 1983	Praktisches Jahr im Akademischen Lehrkrankenhaus, Kempen/Ndrh. sowie in den Universitätskliniken Düsseldorf
	Mai 1983	Bestehen der Ärztlichen Prüfung
Dissertation	seit September 1979	am Institut für Physiologische Chemie II, Universität Düsseldorf
	Juni 1983	Promotionskolloquium